

UNTERSUCHUNG DER INTERAKTION ZWISCHEN
DER DRITTEN KOMPLEMENTKOMPONENTE C3
UND IHREN REZEPTOREN AUF HUMANEN
LYMPHOBLASTOIDZELLEN UND ERYTHROZYTEN
MIT NATÜRLICHEM UND MODIFIZIERTEM C3.

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
dem Fachbereich Medizin —

vorgelegt von
Klaus-Peter Steuhl
aus Laasphe

Mainz 1979

1980

UNTERSUCHUNG DER INTERAKTION ZWISCHEN
DER DRITTEN KOMPLEMENTKOMPONENTE C3
UND IHREN REZEPTOREN AUF HUMANEN
LYMPHOBLASTOIDZELLEN UND ERYTHROZYTEN
MIT NATÜRLICHEM UND MODIFIZIERTEM C3.

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
dem Fachbereich Medizin

vorgelegt von
Klaus-Peter Steuhl
aus Laasphe

Mainz 1979



Dekan: Prof. Dr. med. H. Leithoff

1. Gutachter: Prof. Dr. med. M. P. Dierich

2. Gutachter: Prof. Dr. med. J. Kutzner

Tag der mündlichen Prüfung: 16. 1. 1980

Diese Arbeit wurde im Institut für Medizinische
Mikrobiologie der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz (Direktor: Prof. Dr. P. Klein) angefertigt.

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
A. <u>Einleitung</u>	1
1. Das Komplementsystem	1
2. Die Proteinstruktur und deren Beeinflussung durch Denaturierung	8
3. Vorstellung zum Aufbau der Zellmembran und zum Rezeptorbegriff	19
4. Der C3-Rezeptor	24
B. <u>Eigene Fragestellung</u>	28
C. <u>Material und Methoden</u>	30
1. Chemikalien, Lösungen, Kulturmedien	30
2. Verwendete C3-Präparate	33
3. Zellen	37
4. Markierung von C3 mit ^{125}J	39
5. Proteinbestimmung nach Lowry	41
6. Bindungstests mit Raji-Zellen und humanen Erythrozyten	42
6.1. Grundsätze	42
6.2. Variation der Reaktionsbedingungen (Temperatur, pH, Zeit, Salzkonzentration)	43
6.3. Vergleich verschiedener C3-Präparate	45
6.4. Veränderung der Zellmembran (Novocain, DFP, Glutaraldehyd)	46

7. Berechnung der Bindungskonstante zwischen C3 und Raji-Zellen (Ableitung der Scatchard-Gleichung)	47
8. Hemmung der Rosettenbildung von Lymphozyten mit $EA^{g1}C^{hum}$ durch unterschiedlich behandelte C3-Präparate	50
9. Bindungsstudie unter Verwendung von denaturiertem C3	55
10. Anlagerung von ^{125}J -C3 an E^{S-tan} -C3	55
11. Herstellung von Sepharose 4B-C3 und Bindungsstudien mit ^{125}J -C3	56
12. Aufnahme der CD-Spektren unterschiedlicher C3-Präparate	58
13. Aminosäureanalyse von nativem und bestrahltem C3 (1000 rad)	59

D. Ergebnisse

1. Bindungsstudien mit nativem C3 an Raji-Zellen, an humanen Erythrozyten und Berechnung der Bindungskonstante	60
2. Untersuchung der Bindung von C3 an C3-tragende Partikel (E^{tan} -C3 und Sepharose 4B-C3)	80
3. Wirkung der Modifizierung von C3 auf dessen Fähigkeit zur Bindung an Raji-Zellen sowie zur Rosettenhemmung	86
4. Bindungsstudien unter veränderten Milieubedingungen	100

	Seite
5. Bindungsstudien nach Veränderung der Membraneigenschaften von Raji-Zellen	109
6. Vergleich von nativem und modifiziertem C3 im Hinblick auf ihren zirkulären Dichroismus (CD-Spektren) und ihre Aminosäurezusammensetzung	115
<u>E. Diskussion</u>	120
1. Bindungsstudien mit nativem C3 an Raji-Zellen und humane Erythrozyten	120
2. Berechnung der Bindungskonstante von C3 an Raji-Zellen	123
3. Untersuchung der Bindung von C3 an C3-tragende Partikel	126
4. Wirkung der Denaturierung von C3 auf sein Bindungsverhalten an Raji-Zellen sowie auf seine Fähigkeit zur Rosettenhemmung	126
5. Bindungsstudien unter veränderten Milieubedingungen sowie nach Veränderung der Membraneigenschaften von Raji-Zellen	134
6. Bestimmung der Sekundärstruktur mit Hilfe von CD-Spektren und Erstellung einer Aminosäureanalyse von nativem und denaturiertem C3	136
7. Schlußfolgerung	140
<u>F. Zusammenfassung</u>	141
<u>G. Literaturverzeichnis</u>	144

A. Einleitung

In dieser Arbeit soll die Bindung der dritten Komplementkomponente an entsprechenden Rezeptoren auf Lymphozyten und Erythrozyten und die Möglichkeit, diese Beziehungen zu beeinflussen, untersucht werden. Daher wird einleitend ein kurzer Überblick über das Komplementsystem, über bestimmte Aspekte der Proteinstruktur und über heutige Vorstellungen zur Membranstruktur sowie über die Rezeptorproblematik gegeben.

1. Komplement

1.1. Geschichtlicher Überblick

Die Fähigkeit des Organismus, körperfremde Substanzen als solche zu erkennen und zu eliminieren, ist an zwei Abwehrsysteme, die zelluläre und die humorale Abwehr, gebunden. Ein wichtiger Faktor des humoralen Abwehrmechanismus ist das Komplement. Dieser Begriff wurde um die Jahrhundertwende von Paul Ehrlich (35, 36) eingeführt, um damit einen Wirkstoff zu charakterisieren, der den Antikörper in seiner zytotoxischen Wirkung zu ergänzen schien. Man hatte festgestellt, daß Komplement einmal die Zytolyse antikörperbeladener Zellen bewirken kann, und daß zum anderen Antikörper (Ak) und Antigen (Ag) zusammen als Immunkomplex die Kom-

plementaktivität des Serums vermindern. Ohne zu wissen, ob hinter dem Begriff Komplement eine charakterisierbare Substanz steht, oder ob die oben beschriebene Wirkung nur auf durch Ag/Ak-Reaktion ausgelösten Milieuveränderungen beruht, wurde der Begriff Komplement mit dem Hintergedanken eines stofflichen Korrelats weiter behalten.

Erst in den Jahren 1907 bis 1926 wurde die stoffliche Korrelation zur Komplementfunktion untermauert (9, 38, 45, 149). Durch die in dieser Zeit durchgeführten Untersuchungen gelang es, vier verschiedenen Serumbestandteilen Funktionen zuzuordnen, die mit der Komplementwirkung bei der Immunabwehr in enger Beziehung standen.

Erst dreißig Jahre später war es dann möglich, anhand sensibilisierter Schafserythrozyten die bisher bekannten vier Komplementkomponenten funktionell zu charakterisieren. Dies wurde dadurch möglich, daß die komplementbedingte Lyse sensibilisierter Schafserythrozyten in ihren Zwischenschritten dargestellt werden konnte (82, 83). Danach wurden die mit den Komplementkomponenten C1, C4 und C2-beladenen, sensibili-

sierten Schafserythrozyten durch die abschließende Einwirkung von C3 lysiert. Weiterführende Untersuchungen zeigten, daß die als C3 beschriebene Komponente in 6 verschiedene Einzelkomponenten unterteilt werden konnte (60, 91, 147). Ende der 60iger Jahre konnten dann durch Müller-Eberhard u. Mitarbeiter die zahlreichen Komplementkomponenten gereinigt und funktionell charakterisiert werden (92, 93). Dies gab der modernen Komplementforschung die Möglichkeit, mit Hilfe der isolierten Komplementkomponenten einen tieferen Einblick in die genaue Funktion des Komplementsystems zu gewinnen und zwischen einem klassischen und einem alternativen Weg der Komplementaktivierung zu differenzieren.

1.2. Funktion des Komplementsystems

1.2.1. Der klassische Komplementaktivierungsweg

Heute ist bekannt, daß der klassische Komplementaktivierungsweg über mindestens 11 unterschiedliche Proteine abläuft. Die Proteine werden als C1q, C1r, C1s, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8, C9 bezeichnet. Soweit bisher bekannt ist, sind alle Komponente Glykoproteine (94) z. T. mit Proenzymcharakter wie C1r, C1s und C2 (96).

Während C6 und C7 aus nur einer Polypeptidkette bestehen, sind C1s, C1r, C3 und C5 aus zwei (94) und C1q (113), C4 (124) und C8 (79) aus drei Polypeptidketten aufgebaut. Der Aufbau von C2 und C9 ist noch nicht näher bekannt.

Der klassische Komplementaktivierungsweg läuft dann ab, wenn sich im humoralen System des Körpers ein aus IgG bzw. IgM und Antigen zusammengesetzter Immunkomplex gebildet hat. Als erstes bindet sich die sog. Erkennungseinheit C1 an das FC-Stück des antigegebundenen Antikörpers (3, 53, 136). Das C1-Molekül besteht aus drei Komponenten: C1q, C1r und C1s. C1q ist das Protein, das die Bindung zum FC-Stück eines IgM- bzw. IgG-Antikörpers ermöglicht. Aus der Bindung des C1q-Moleküls resultiert eine Aktivierung des ganzen C1-Komplexes. Diese Reaktion ist Ca^{2+} -abhängig (96).

Dieses aktivierte C1s spaltet nun C4 und C2 in C4a und C4b bzw. C2a und C2b (95, 96). Die beiden größten Teilstücke, nämlich C4b und C2a lagern sich nach dieser Spaltung zusammen und bilden den $\overline{\text{C4b2a}}$ -Komplex, der C3-Konvertase genannt wird (97). Dieser $\overline{\text{C4b2a}}$ -Komplex hat

durch eine labile Bindungsstelle die Möglichkeit, sich an die Zelloberfläche zu binden (96, 97). Das Enzym $\overline{C4b2a}$ hat C3 als Substrat. Vorbeiflutendes C3 wird durch das $\overline{C4b2a}$ -Enzym in C3a und C3b gespalten und damit aktiviert. C3a hat in der Komplementsequenz keine Funktion; es bleibt in der flüssigen Phase und gewinnt klinisch als Anaphylatoxin eine wichtige Bedeutung bei der Entzündungsreaktion (Degranulation und Histaminausschüttung von Mastzellen und Muskelkontraktionen (21, 56)). Auf der C3b-Untereinheit wird nach der enzymatischen Spaltung von C3 eine labile Bindungsgruppe generiert, die es dem C3-Molekül ermöglicht, sich auf der Zelloberfläche an sog. C3-Akzeptoren anzulagern und zusammen mit $\overline{C4b2a}$ den $\overline{C4b2a3b}$ -Komplex zu bilden (6). Außerdem ist ein C3b-Molekül, das über die labile Bindungsgruppe an den C3-Akzeptor einer Zelle angelagert wurde, in der Lage, über stabile Bindungsgruppen (SBG1 und SBG2) Komplexe mit anderen Zellen (z. B. humanen Erythrozyten und B-Lymphozyten) zu bilden (5, 24, 51, 52, 70, 99, 100, 101, 141). Dieses Phänomen leitet unter bestimmten Umständen die Phagozytose ein (42, 81, 99), weshalb C3b als opsonisierender Faktor bezeichnet wird. Der oben beschriebene $\overline{C4b2a3b}$ -Komplex wird auch

C5-Konvertase genannt, da er C5 als Substrat umsetzt (12). Dabei entstehen ein kleines (C5a) und ein großes (C5b) Fragment. C5a wird als zweite anaphylaktisch wirkende Substanz angesehen. C5b wird wahrscheinlich, ähnlich wie C3b, auf der Zelloberfläche gebunden und bestimmt damit den Ort, an dem die Lyse der Zellmembran einsetzt. Nach Bindung von C6 und C7 an C5b entsteht ein neuer Komplex aus diesen drei Molekülen. Dieser Komplex ist nun in der Lage, C8 zu assoziieren. Es entsteht dadurch ein aus vier Untereinheiten aufgebauter Reaktionskomplex, der sechs Bindestellen für C9 aufweist (63, 64, 65). Besteht dieser Komplex nur aus den Komponentkomponenten C5b, C6, C7 und C8, so ist er in der Lage, die Ausbildung eines transmembranen Tunnels zu bewirken. Bei zusätzlicher Anlagerung von C9 wird der Ionenaustausch zwischen Zellinnerem und Zelläußerem und damit die Zytolyse stark beschleunigt (96). Nach M.M. Mayer reicht eine einzige Läsion der Zellmembran durch einen C5/C9-Komplex zur Lyse der Zelle aus (Ein-Treffer-Theorie, 84, 85).

1.2.2. Die alternative Komplementaktivierung (der Properdin-Aktivierungsweg)

Neben der klassischen Komplementaktivierung ist es möglich, das Komplementsystem über einen Nebenweg, bei Umgehung der Antikörper und der C1-, C4- und C2-Moleküle zu aktivieren (37, 47). Das dazu benötigte C3b-Molekül wird nach heutigem Wissensstand auf verschiedene Art und Weise, z. B. durch Enzyme des Gerinnungssystems, dauernd in geringer Menge generiert. Üblicherweise wird diese C3b-Menge laufend inaktiviert. Die Entscheidung, ob der alternative Aktivierungsweg eingeschlagen wird, fällt mit der Bindung von C3b an einen Aktivator oder Nichtaktivator (125). Wird das C3b-Molekül an einen Aktivator gebunden, so kann sich $\beta 1H$ nicht mehr so leicht anlagern ($\beta 1H$ ermöglicht es dem C3b-Inaktivator, C3b in C3c und C3d zu spalten und damit zu inaktivieren), eine Möglichkeit, die bei Anlagerung an einen Nichtaktivator gegeben wäre (146). Das an einen Aktivator angelagerte C3b-Molekül kann nun seinerseits Faktor B binden. Dieser C3bB-Komplex wird durch Einwirkung

von Faktor D in das C3bBb-Enzym überführt. Dieses Enzym vermag nun weitere C3-Moleküle in C3a und C3b zu spalten; so entstehen schließlich Einheiten, die neben Faktor B aus mehreren C3b-Molekülen zusammengesetzt sind. Dieser C3b_nBb-Komplex hat nun C3/C5-Konvertaseaktivität, womit er ein Äquivalent zum C5-Konvertasekomplex des klassischen Aktivierungsweges wird (87, 88, 125). Als Kontrollmechanismus treten u.a. $\beta_1\text{H}$ mit dem C3-Inaktivator auf, die den Verfall von C3b in C3c und C3d beschleunigen (102, 120, 146, 148), und zum anderen Properdin, das nach Bindung an den C3b_nBb-Komplex diesen stabilisiert und seine enzymatische Aktivität steigert (48, 96, 131). Beide Aktivierungswege haben letztlich mit Ausbildung des C5b-C9-Komplexes die Zellyse zur Folge.

2. Proteinstruktur und deren Beeinflussung durch Denaturierung

Um die Auswirkung einer Denaturierung der 3. Komplementkomponente, wie sie im Resultateteil beschrieben wird, genauer untersuchen zu können, ist es wichtig, sich nochmals kurz Klarheit über die allgemeinen Strukturgesetzmäßigkeiten nativer Proteine zu verschaffen (71, 111, 112). Als Primärstruktur eines Proteins bezeichnet man dessen Aminosäuresequenz, d. h. die Reihenfolge

der über Peptidbindungen zusammengehaltenen Aminosäuren. Am Kettenanfang steht demnach eine Aminosäure mit freier Aminogruppe, und am Kettenende steht eine freie Carboxylgruppe. In Lösungen nehmen Polypeptide eine ganz bestimmte räumliche Anordnung (Konformation) ein. Für die Konformation einer Polypeptidkette, die auch als Sekundärstruktur bezeichnet wird, sind zahlreiche Formen möglich, deren Grundlage die Bindungswinkel und die prinzipiell freie Drehbarkeit der C-C- bzw. C-N-Bindungen ist. Weiter wichtig für die Sekundärstruktur der Proteine sind zusätzlich zur Peptidbindung vorhandene Bindungen. Dazu gehört eine Kovalente (die Disulfidbindung) und mehrere, nicht kovalente Bindungsformen. Die Disulfidbrücken können zwischen Cysteinresten der gleichen Peptidketten oder verschiedenen Ketten ausgebildet werden. Sie entstehen durch Dehydrierung zweier S-H-Gruppen. Zu den nicht kovalenten Gruppen zählen einmal die heteropolaren (-Ionen) Bindungen, die zwischen den elektronegativen bzw. elektropositiven Gruppen saurer oder basischer Aminosäuren auftreten. Schwache Bindungskräfte (van der Waal'sche Kräfte) können sich auch zwischen den apolaren Kohlenwasserstoffresten aliphatischer Aminosäuren ausbilden. Für den weiteren Zusammenhalt der Sekundärstruktur von Proteinen sorgen die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Wasserstoffatom einer NH-Gruppe und dem Sauerstoffatom einer CO-Gruppe. Diese Bindungen haben zwar eine geringere Bindungsenergie

als die Disulfidbrücken, beeinflussen aber die Kettenkonformation aufgrund ihrer großen Zahl stark. Bei den Faserproteinen ist die Ausbildung der α -Helix, des Kollagentyps und der β -Form als Sekundärstruktur bekannt. Die α -Helix ist eine Spiralform des Proteins, die für eine Umdrehung 3,7 Aminosäurereste braucht und eine Ganghöhe von 5,44 Å aufweist. Der Kollagentyp stellt ebenfalls eine spiralige Anordnung dar, deren Ganghöhe jedoch 8,6 Å beträgt. Die β -Form (oder Faltblattstruktur parallel gelagerter Proteinketten) tritt dann auf, wenn man die Helixfasern durch Behandlung mit feuchter Wärme auf das Doppelte ihrer ursprünglichen Länge dehnt.

Die räumliche Anordnung eines Proteins im dreidimensionalen Raum, die durch die Summe aller beschriebenen Bindungskräfte und Wechselwirkungen entsteht, wird als Tertiärstruktur eines Proteins bezeichnet. Dabei wird vom Protein immer die Struktur eingenommen, die ihm letzten Endes von seiner jeweiligen Aminosäuresequenz vorgegeben ist. Beträgt das Achsenverhältnis eines Proteins in der Tertiärstruktur 2:1, bezeichnet man es als globuläres Protein; ist dieses Verhältnis größer (bis zu 30:1), liegt ein fibrilläres Protein vor. Die Zusammenlagerung mehrerer Proteinuntereinheiten zu einem Komplex bezeichnet man als Quartärstruktur eines Proteins. Dabei sind die Untereinheiten

nicht durch Peptidbindungen miteinander verknüpft. Diese Untereinheiten bestehen meist aus mehreren Polypeptidketten.

Die Stabilität dieser Strukturkomponenten der Proteine ist essentiell für deren Funktion, weshalb man bei biologisch aktiven Proteinen funktionelle Einbußen als Folge einer Strukturveränderung findet. Solche Strukturveränderungen lassen sich mit Hilfe verschiedener, denaturierender Lösungen, durch Wärme, durch Bestrahlung oder andere unphysiologische Einwirkungen erzielen.

Die wohl allgmeinste Definition für das Phänomen Denaturierung ist folgende: Denaturierung ist jede Veränderung der Sekundär-, Tertiär- oder Quartärstruktur eines Proteins, die eine Abwandlung der chemischen, physikalischen oder biologischen Eigenschaften eines Proteins zur Folge hat (57, 59, 114, 134). Oft drückt eine Veränderung der chemischen, physikalischen bzw. biologischen Eigenschaften eines Proteins den Grad der Denaturierung aus (57). Zu den biologischen und chemischen Eigenschaften gehören: serologische Spezifität, Enzymaktivität und spezifisches Bindungsvermögen; zu den physikalischen Eigenschaften zählen Achsenverhältnisse, Molekülform, optisches Drehvermögen, Löslichkeit und elektrophoretische Beweglichkeit.

Von allgemeiner Gültigkeit ist, daß nach Denaturierung Proteinlösungen stets eine höhere Viskosität haben als vorher, was mit der nahezu immer zu beobachtenden Aggregation, mit der veränderten Hydratation, mit der Auffaltung von Polypeptidketten sowie mit der ungleichmäßigen Vergrößerung denaturierter Proteine zusammenhängt (57). Ebenfalls von Allgemeingültigkeit ist, daß bei denaturierten Proteinen eine Veränderung des isoelektrischen Punktes und damit des Titrationsverhaltens und der elektrophoretischen Beweglichkeit gefunden wird, was mit der Verlagerung ionaler Gruppen an die Moleküloberfläche erklärt wird. Bei Proteinen, deren Struktur durch Disulfidbrücken bestimmt wird, gehen oft Veränderungen dieser physikalischen Eigenschaften mit der Zerstörung der Disulfidbrücken einher (134). Die Fähigkeit denaturierter Proteine, Verbindungen mit anderen organischen Substanzen einzugehen, ist von Protein zu Protein verschieden. Zum Beispiel verliert Rinderalbumin nach Erhitzung oder Behandlung mit alkalischen Lösungen die Fähigkeit, sich an aromatische Anionen anzulagern (62). Das Gegenteil, eine erhöhte Bereitschaft Bindungen einzugehen, trifft man bei denaturierten Proteinen aber häufiger. Zum Beispiel erhöht milde Denaturierung des Globinmoleküls dessen Fähigkeit, Häm-moleküle anzulagern,

auf das 6-fache (61). Weiterhin ist Serumalbumin nach Hitzedenaturierung in der Lage, mehr Farbstoff (wie z. B. Kongorot) zu binden (50, 132). In den Jahren 1940-1942 wurde von Pauling und Campbell festgestellt, daß Proteine unter bestimmten Umständen spezifische Affinitäten, ähnlich denen eines Antikörpers, gewinnen können, wenn sie langsam, im Beisein antigener Substanzen, denaturiert werden (108, 109).

Kaliumbromid oder Ionen anderer Salze haben in niedrigen Konzentrationen einen positiven Effekt auf die Löslichkeit, indem sie ungleichmäßige Ladungen der Proteinmoleküle neutralisieren. Wird jedoch die Ionenkonzentration weiter erhöht, so beginnen die Ionen mit den Proteinen um die Wasserdipole zu konkurrieren. Dadurch wird der Wassermantel der Proteine vermindert, was schließlich zur Ausfällung der Proteine führt (112). Nach Behandlung der Proteine mit steigenden Salzkonzentrationen findet man auch Veränderungen in der Molekülstruktur. Bei Myosin z. B. läßt sich eine Verminderung der helikalen Anteile zugunsten einer kompakten, globulären Struktur mit hohem Random-Coil-Anteil nachweisen (140). Weiter ist bekannt, daß Salze wie KSCN und CaCl_2 auf die Struktur von Makromolekülen wie Ribonuklease, Kolla-

gen oder DNA einen stark destabilisierenden Effekt haben (144). Bei niedrigen Salzkonzentrationen wurde für Serumalbumin und Ribonuklease der gegenteilige Effekt, nämlich eine Stabilisierung der Struktur, festgestellt. Aus diesem Grund bezeichnet man in niedrigen Konzentrationen (0,1 M.) eingesetztes Salz (z. B. Lithiumbromid) auch als Schutzsubstanz für Proteine gegen Denaturierung (57, 134, 144).

Die Proteindenaturierung durch Reagenzien mit Thiolgruppen, wie Mercaptoäthanol, führt zur Auflösung der Disulfidbrücken. Diesen Zustand kann man durch anschließende Acetylierung des Schwefels (z. B. mit Iodacetamid) manifestieren (134). Globuläre Proteine neigen nach Spaltung der SH-Brücken meist zu einer Entfaltung ihrer Struktur, was ein Ansteigen der Viskosität der Proteinlösung, der Molekülgröße sowie eine Verminderung der elektrophoretischen Beweglichkeit zur Folge hat (154).

Die Denaturierung durch Harnstoff kommt hauptsächlich dadurch zustande, daß Harnstoff eine starke Fähigkeit hat, Wasserstoffbrücken zu bilden. In diesem Punkt konkurriert das Harnstoffmolekül mit der NH-Gruppe einer Peptidbindung um die Wasserstoffbrücke einer benachbarten Peptidbindung. Das bedeutet, daß Proteine durch Harnstoff in Submoleküle

zerlegt werden können, wenn Wasserstoffbrückenbindungen einen größeren Anteil an der Aufrechterhaltung der Struktur dieser Proteine haben. Dazu trägt auch die Tatsache bei, daß Harnstoff auch Disulfidbrücken angreift (57, 134). Beides führt dazu, daß durch Harnstoff denaturierte Proteine meist in Lösungen bleiben (40). Im allgemeinen macht sich die denaturierende Wirkung von Harnstoff erst in relativ hohen Konzentrationen bemerkbar (77). Aber oft sind auch bei hohen Harnstoffkonzentrationen die Proteine noch resistent gegen Denaturierung (72, 134).

Bei der Denaturierung durch Bestrahlung ist bekannt, daß dadurch eine starke strukturelle Alteration von Proteinen bewirkt wird. Dies ist einmal durch die Labilisierung von Wasserstoffbrückenbindungen bedingt (gemessen durch einen erhöhten Austausch tritiummarkierten Wasserstoffs der bestrahlten Proteine (126, 129)). Weitere strukturelle Veränderungen treten durch die Bildung von Schwefelradikalen und die dadurch bedingte Unfähigkeit dieser Schwefelatome, Disulfidbrücken zu bilden, auf (27, 129). Bei der Bestrahlung von Ribonuklease wurde festgestellt, daß es zu einer Verminderung der Aminosäuren Cystin, Methionin, Thyrosin, Phenylalanin, Lysin und Histidin

und zu einer Vermehrung von Glycin kommt. Man nimmt nun an, daß der entscheidende Grund für die biologische Inaktivität von bestrahlten Enzymen die Konformationsveränderungen sind. Ein Anzeichen für diese Konformationsveränderungen durch Bestrahlung ist die Aggregationsneigung und der erleichterte Abbau von bestrahlten Proteinen durch Trypsin (129). Strahleninduzierte Brüche von Polypeptidketten wurden bei Proteinen mit Helixstruktur häufiger beobachtet als bei globulären Proteinen. Diese Kettenbrüche sind nach Ansicht einiger Autoren auch wesentlich für die Inaktivierung von Enzymen (126).

Hitzeeinwirkungen auf Proteine führt im allgemeinen zum Aufbrechen von Bindungen, da durch die erhöhte Temperatur Atomgruppen im Molekül in Schwingungen versetzt werden. Die sich bildenden Molekülbruchstücke neigen dann vermehrt zur Aggregation, was bei hohen Proteinkonzentrationen dazu führt, daß das denaturierte Protein in den Gel-Zustand übergeht (57). Dieser Verlust an Löslichkeit geht aber nicht unbedingt mit einer drastischen Konformationsänderung des Proteins einher, sondern kann auch schon dann eintreten, wenn es möglich wird, daß die durch Molekülbrüche erzeugten Moleküle kovalente Bindungen untereinander eingehen (39, 134).

Dieses Phänomen bedeutet, daß Polymerisation nicht mit hochgradiger Konformationsänderung, d. h. Denaturierung, gleichzusetzen ist. An physikalisch bestimmbaren Eigenschaften läßt sich eine Veränderung der Molekülgröße und -form, eine inhomogene, elektrophoretische Beweglichkeit, und z. B. bei humanem Albumin eine erhöhte Empfindlichkeit gegen Trypsin feststellen (57).

Auf die Einwirkung von Lösungen mit verschiedenen pH-Werten reagieren Proteine recht unterschiedlich; manche sind nach geringer Abweichung vom isoelektrischen Punkt denaturiert, andere behalten ihre strukturelle Integrität in großen pH-Bereichen bei (1, 134, 151). Die Zugabe von Wasserstoffionen als denaturierendes Reagenz bewirkt eine Protonenanlagerung, vor allem an die COO-Gruppen. Dadurch lösen sich Ionenbindungen, und Wasserstoffbrückenbindungen werden labilisiert, was eine Auflockerung der Struktur und Molekülform mit sich bringt (112). Bei Zugabe von basischen Lösungen geben die freien Aminogruppen bzw. die Thyrosinreste jeweils ein Proton ab und werden dadurch unfähig, mit den Carboxylgruppen anderer Aminosäuren über Wasserstoffbrückenbindungen in Kontakt zu treten. Basische pH-Werte haben auch

einen Einfluß auf freie SH-Gruppen. Ihr Vermögen, diese zu oxydieren, führt dazu, daß sich neue Disulfidbrücken bilden, was eine Erklärung für die starke Aggregationsneigung basischer Proteine sein kann (10, 57, 134). Durch den pH-Einfluß ist also besonders die Löslichkeit der Proteine über Ladungsveränderungen leicht zu beeinflussen. Weiter zeigen z. B. Plasmaalbumin und Hämoglobin im sauren pH-Bereich eine veränderte, optische Drehung und einen Anstieg der Viskosität, was hauptsächlich auf einer Expansion des Moleküls beruht (130, 135, 152). Serum γ -Globulin zeigt im sauren pH-Bereich ähnliche Veränderungen. Im alkalischen pH-Bereich verhalten sich einige Proteine genauso wie im sauren Bereich. Andere wie Hämoglobin und Myoglobin zeigen unterschiedliche Reaktionen. Sie sind bei alkalischem pH stabiler als bei saurem pH (57). Die auffallendste physikalische Reaktion der Proteine auf einen alkalischen pH-Wert ist die Aggregation. Zum Beispiel geht Pferdealbumin bei einer Konzentration über 4,5 % in einen Gel-Zustand über (57), und bei niedriger Proteinkonzentration findet man eine starke Erhöhung der Viskosität.

3. Aufbau der Zellmembran und der Rezeptorbegriff

3.1. Vorstellung zum Aufbau der Zellmembran

Die historische Entwicklung des Wissensstandes über die Zellmembran begann 1899 mit Overtons Entdeckung, daß Zellmembranen durchlässiger für Lipide als für wasserlösliche Substanzen sind. Daraus wurde geschlossen, daß die Lipide eine besondere Rolle beim Aufbau von Membranen spielen (107). An den Zellmembranen roter Blutkörperchen konnten 1925 Gorter und Grendel in quantitativen Untersuchungen nachweisen, daß die Lipide in der Membran in Art einer Doppelschicht (bilayer) angeordnet sind (46). Ihre Annahme, daß dabei die polaren Gruppen der Lipide entlang der Außenseite der Membran zu finden und die apolaren Kohlenwasserstoffketten im Inneren aufeinander zugeordnet sind, hat bis heute Gültigkeit. 1935 wurde von Danielli und Davson die erste Modellvorstellung über den grundsätzlichen Aufbau von Zellmembranen entwickelt (19). Diese beinhaltete neben dem, was Gorter und Grendel dargelegt hatten, daß die zwei hydrophilen Reste der beiden Lipidschichten einen Abstand von 30-40 Å haben, und daß an diesen hydrophilen Fett-

säureresten beiseitig globuläre Proteine gebunden sind. 1943 wurde von Danielli und Davson in einer weiteren Veröffentlichung (20) dargelegt, daß an diesen Proteinschichten weitere globuläre Proteine adsorbiert werden können.

Dieses Membranmodell wurde 1957 von Robertson als "unit membrane" definiert, da er elektrophoretisch die Gültigkeit dieses Modells für alle Tierspezies nachweisen konnte (115). 15 Jahre später erwies sich die Ansicht, bei der "unit membrane" würde es sich um ein starres System handeln, als falsch. 1972 wurde die Membranstruktur von Singer und Nicolson als flüssiges System dargestellt, dessen Komponenten über laterale Mobilität verfügen (127). Die für uns wichtigsten Komponenten dieser Membran sind die integralen Proteine. Es sind amphotere Moleküle, die mit ihren apolaren Gruppen im Inneren der Membran verankert sind, während die polaren Gruppen über die Membran hinausragen. Diesen integralen Proteinen werden u.a. Funktionen von Enzymen und Hormonrezeptoren zugeordnet (15, 67, 74, 78). Im Gegensatz zu diesen Proteinen stehen die peripheren Proteine, die nur locker mit der Membran assoziiert sind. Sie treten meist mit der polaren Gruppe der integralen Proteine in Kontakt. Unter ihnen findet man Polypeptidhormone

(Acetylcholin, Insulin und Glucagon) (16, 58, 116) und andere Proteine (22, 30). Durch das Phänomen der Lateralmobilität der integralen Proteine läßt sich auch besonders gut die Entstehung von Proteininseln, das sog. "patching" und "capping", erklären (75, 103, 137).

3.2. Der Rezeptorbegriff

Den schon für die Funktion der integralen Proteine benutzten Begriff Rezeptor gilt es im folgenden näher zu definieren und abzugrenzen. 1878 wurden von Langley die Orte auf der Membran von Muskelzellen bestimmt, die durch Anlagerung von Nikotin eine Muskelkonzentration initiieren und gleichzeitig durch Blockierung mit Curare für Nikotin unzulänglich gemacht werden konnten (68, 69). Diesen Membranarealen auf der Muskelzelle gab Langley die Bezeichnung "receptive substance".

Dieses Modell wurde in neuester Zeit durch die Isolierung weiterer Membranareale, die durch Anlagerung bestimmter Substanzen zum Ausgangspunkt bestimmter Zellfunktionen werden, bestätigt (16, 43). Unabhängig von Langleys Vorstellungen gab Paul Ehrlich eine präzise Definition des Begriffs "Rezeptor". Nach seiner Ansicht werden auch antigen wirkende Substanzen an bestimmte Membranareale

der Zelle gebunden. Diese werden dann samt Rezeptor abgestoßen, und der Rezeptor von der Zelle im Überschuß regeneriert. Diese überschüssigen Rezeptoren sollten dann in der Blutbahn gegen antigene Substanzen wirken (Immunkörper). Das heißt, die antigen wirkende Substanz wird an spezifische Membranareale gebunden und ist signalgebend (32, 33, 34).

In neuester Zeit versteht man unter dem Begriff Rezeptor wesentlich mehr als ursprünglich von Langley und Ehrlich darunter verstanden wurde. Nach Dierich (23) lassen sich vier Gebrauchsformen des Begriffs Rezeptor erkennen:

1. Als Rezeptor im strengsten Sinne versteht man nach wie vor einen auf Zellen befindlichen, signalvermittelnden Bindungsort für spezifisch konfigurierte Stoffe. Diese können den biologischen Zustand der betreffenden Zelle entscheidend verändern (Beispiele: Acetylcholin-Rezeptor, Insulin-Rezeptor, Histamin-Rezeptor, antigenspezifischer Primärrezeptor nicht stimulierter Immunzellen (43, 141)).

2. Als Rezeptor im weniger strengen Sinne bezeichnet man einen auf der Membran lokalisierten Bindungsort für spezifisch konfiguriertes Material ohne erkennbare Signalabgabe nach der Bindung (neuraminsäurehaltige Rezeptoren für Myxoviren auf Hühnererythrozyten, Forßmann-Determinanten auf Erythrozyten (128)).
3. Man bezeichnet gelegentlich makromolekulare Teilstrukturen ohne Bezug zur Zellmembran als Rezeptoren, z. B. die für das Substrat bestimmten Haftstellen auf Enzymen oder die für die Determinante bestimmten Bindungsstellen am Schenkelende des Antikörpers. Diese Bezeichnung sollte vermieden werden und durch Termini wie Haftstelle, Adsorptionszentrum oder Bindungsgruppe ersetzt werden.
4. Als Rezeptor bezeichnet man weiterhin Strukturen, die nicht spezifisch konfiguriert sind, sondern durch physiko-chemische Elemente unspezifisch zustande kommen (z. B. Säure- oder Basenreste auf Ionenaustauschern). Charakteristisch für die Strukturen ist ihre Austauschbarkeit: Als Säurerest kann z. B. eine Carboxylgruppe sowie eine Sulfatgruppe fungieren. Auch hier sollte der Begriff Rezeptor vermieden werden.

Das bedeutet, daß streng genommen nur die ersten beiden Definitionen von dem Begriff Rezeptor erfaßt werden sollten. Danach läßt sich der Rezeptor als signalvermittelnder Bindungsort für ein strukturspezifisches Molekül bezeichnen. In neuester Zeit werden nicht nur monomolekulare, sondern auch plurimolekulare Rezeptoren beschrieben, die aus dauerhaften Verbänden von Lipoproteinmolekülen bestehen (103).

Zusätzlich zu den hier angesprochenen Kriterien des Rezeptors kommt der Affinität zwischen dem Rezeptor und dem von ihm gebundenen Liganden eine besondere Bedeutung zu (15, 16, 66). Dabei läßt sich die Spezifität zwischen Ligand und Rezeptor anhand der Größe der Dissoziations- bzw. der Assoziationskonstante aufzeigen. Bei einer Dissoziationskonstante von $\leq 10^{-6}$ M kann man von einer hohen Affinität und damit hohen Spezifität zwischen Ligand und Rezeptor sprechen.

4. Der C3-Rezeptor

Das C3-Molekül ist aus zwei Peptidketten gebaut, dessen α -Kette ein Molekulargewicht von 115 000 und dessen β -Kette ein Molekulargewicht von 75 000 aufweist. Diese beiden Polypeptidketten sind durch Disulfidbrücken und nicht kovalente Bindungen miteinander verbunden. Die in 1.2.1. und 1.2.2. erwähnten C3-Konvertasen spalten das C3-Molekül in C3a

(MG:9000) und C3b (MG:181000) (7,21). C3b wird weiterhin durch im Serum befindlichen C3b-Inaktivator (C3b-INA oder KAF), durch β 1H und kleinste Proteasemengen in C3c und C3d gespalten (120, 146). Nach Fragmentierung des C3-Moleküls in C3a und C3b wird auf dem C3b-Molekül eine kurzlebige (=labile) Bindungsgruppe generiert. Mit dieser Bindungsgruppe ist das naszierende C3b-Molekül in der Lage, sich an den Akzeptor auf der Zelloberfläche zu binden und kann dann den weiteren Ablauf der Komplementkaskade initiieren. Wird das C3b-Molekül nicht sofort in statu nascendi an die Zellmembran gebunden, verfällt diese labile Bindungsgruppe. Die stabilen Bindungsgruppen (SBG1 und SBG2), die in neuester Zeit auf dem C3b- und auf dem C3-Molekül nachgewiesen wurden (24), werden für die Bindung der C3-Fragmente bzw. des C3-Moleküls an C3-rezeptortragende Zellen verantwortlich gemacht (s. a. 1.2.1.). Auf dem C3b-Fragment findet sich die SBG1 und die SBG2, auf dem C3d-Molekül ist die SBG2 lokalisiert (24). C3b, das in naszierendem Zustand über die labile Bindungsgruppe an die Zellmembran gebunden wurde, zeigt das Phänomen der Immunadhärenz. Das bedeutet, daß sich z. B. komplementbeladene, sensibilisierte Schafserythrozyten (EAC1423b) an C3-rezeptortragende Blutbestandteile (z. B. B-Lymphozyten oder Erythrozyten) anlagern und sog. Rosetten bilden. Eingeführt wurde dieser Begriff von Nelson

(1953), der eine C3-abhängige Bindung von Immunkomplexen an nicht sensibilisierte Zellen beobachtete (99). Aber schon früher wurden ähnliche Phänomene beschrieben, die man "serologic adhäsion" nannte. Dabei wurde die Bindung von Blutbestandteilen wie Leukozyten (Aynaud, 1911), Thrombozyten (Rieckenberg, 1917) und Erythrozyten (Duke und Wallace, 1930, 1931) an verschiedene Bakterienstämme in Anwesenheit spezifischer Antikörper beschrieben. Man wußte damals auch schon von einem hitzelabilen Faktor, der für diese "serologic adhäsion" notwendig war. Diesen hitzelabilen Faktor identifizierte Nelson 1952 als Komplement, als er die Aggregation von Erythrozyten mit antikörperbeladenen *Treponema pallidum*-Spirochäten in Anwesenheit von Komplement beschrieb. Für die Anlagerung dieser Immunkomplexe an Erythrozyten wurde eine sog. C3-Bindestelle auf den Erythrozyten verantwortlich gemacht (99, 105). Diese Bindestelle konnte durch Lay und Nussenzweig (70) präzisiert werden, indem sie Zellpopulationen fanden, die EAC1423-Komplexe anlagerten und damit als C3-rezeptorpositive Zellen identifiziert wurden. Zu den Zellpopulationen gehören: 10-25 % der Lymphknotenlymphozyten, weiterhin Makrophagen, polymorphkernige Leukozyten und Monozyten, aber keine Thymuslymphozyten. In dieser Arbeit ist auch zum ersten Mal die Bildung von Rosetten-

formationen zwischen C3-rezeptortragenden Zellen und komplementbeladenen, sensibilisierten Schafs-erythrozyten als Testsystem für C3 und C3-Rezeptoren beschrieben worden. Die C3-Rezeptoren von Lymphozyten wurden genauer untersucht und in zwei Gruppen unterteilt (23, 118): einmal den Immunadhärenzrezeptor und zum anderen den C3d-Rezeptor. Sie fanden heraus, daß der erste mit C4b- und der C3c-Region (SBG1) von C3b reagiert. Der C3d-Rezeptor war spezifisch für C3d und die C3d-Region von ungespaltenem C3b (SBG2).

B. Eigene Fragestellung

Neben der eben beschriebenen C3-abhängigen Adhärenz von Zellen sind heutzutage noch weitere Phänomene bekannt, die durch die Interaktion von C3 und seinen Fragmenten mit C3-rezeptortragenden Zellen ausgelöst werden. Zu ihnen gehört einmal die Tatsache, daß C3 eine vermittelnde Rolle zwischen Immunkomplexen und phagozytierenden Zellen spielt (2, 31, 80).

Außerdem konnte gezeigt werden, daß nur B-Lymphozyten, nicht aber thymusabhängige Lymphozyten die Möglichkeit haben, mit EAC 1423 zu reagieren (5, 70). Dies warf die Frage auf, ob der C3-Rezeptor spezifische Zellfunktionen vermittelt, wie z. B. die Antikörperbildung der B-Lymphozyten (28, 29, 110).

Unter C3b-Einfluß wird die Proliferation von B-Lymphozyten (49) sowie die Sekretion eines für Monozyten chemotaktisch wirkenden Faktors beobachtet (150). C3b bewirkt weiterhin die Freisetzung lysosomaler Enzyme (β -Glukuronidase, N-Acetyl-Glukosidase) aus Makrophagen (123).

Gleichzeitig wurde auch bekannt, daß der C3-Rezeptor neben C3 auch C4 (13, 118) und C5 (25) anlagert. Diese sich widersprechenden Ergebnisse, einerseits spezifische durch C3 vermittelte Rezeptorfunktionen und andererseits Anlagerung unterschiedlicher Moleküle als Ausdruck relativer Unspezifität veranlaßte uns, die Interaktion zwischen C3 und dem C3-Rezeptor mit Hilfe unterschiedlicher

C3-Präparationen besser zu charakterisieren. Wir stellten uns daher folgende Ziele:

1. Die Zahl der Bindungsstellen für C3 auf verschiedene Zelltypen sollte bestimmt werden.
2. Die Affinitätskonstante, mit der C3 von verschiedenen Blutzellen angelagert wird, galt es zu er- rechnen.
3. Der Einfluß bestimmter Parameter auf die Interaktion zwischen C3 und C3-Rezeptor sollte untersucht werden, wozu wir einmal das C3-Molekül und zum anderen die Zellen bestimmten Einflüssen aussetzen wollten.

Die Frage der Sättigung der C3-Rezeptoren von Raji-Zellen mit C3 war bereits in der Arbeit von Theophilopoulos et al. (138) untersucht worden. Es wurde festgestellt, daß man mit 4×10^5 C3-Molekülen die Aufnahmegrenzen der Raji-Zellen für C3 erreichen würde. In vorläufigen Versuchen unseres Labors konnten diese Ergebnisse jedoch nicht bestätigt werden. Diese Arbeit wird sich damit im einzelnen auseinandersetzen.

C. Material und Methoden

1. Chemikalien, Lösungen, Kulturmedien

1.1. Chemikalien

Äthanol	Merck, Darmstadt
Albumin aus Rinderserum (BSA)	Boehringer, Mannheim
Ambozeptor (gegen E ^S gerichteter Antikörper)	Behring-Werke AG, Marburg
Borsäure (krist.)	Merck, Darmstadt
Chloramin T	Merck, Darmstadt
D (+)-Glukose	Merck, Darmstadt
Diisopropylfluorophosphat (DFP)	K. u. K Laboratories, New York
Dinatriumtetraborat-10-hydrat	Merck, Darmstadt
Dioxan	Merck, Darmstadt
Folinreagenz	Merck, Darmstadt
Gelatine	Merck, Darmstadt
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Merck, Darmstadt
2-Jodacetamid	Merck, Schuchard, München
Kaliumbromid	Merck, Darmstadt
Lecithin aus Eiern	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoäthanol	Fluka, Buchs, Schweiz
Natrium-Carbonat	Merck, Darmstadt
Natrium-Citrat x 2H ₂ O	Merck, Darmstadt
Natrium-5,5-diäthylbarbitursäure	Merck, Darmstadt
2-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdisulfit (trocken)	Merck, Darmstadt

Natrium-Tartrat	Merck, Darmstadt
Natriumthiocyanat (rein)	Merck, Darmstadt
Natrium- ¹²⁵ Jod	New England Nuclear, Boston
Novocain	Farbwerke Höchst AG, Frankfurt
Polyäthylenglykol	Merck-Schuchart, München
Saccharose (reinst)	Merck, Darmstadt
Sepharose 4 B	Roth, Karlsruhe
Tanin (gepulvert)	Merck, Darmstadt
Trypsininhibitoren (Sojabohnen)	Merck, Darmstadt
Triton x 100	Serra, Heidelberg

1.2. Lösungen

Natrium-Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS):

11,5 ml Natriumdihydrogenphosphat (0,2 M)

38,5 ml Dinatriumhydrogenphosphat (0,3 M)

7,47 g NaCl

Aqua dest. ad. 1000 ml

(pH 7,3; 14 ms; 10 mM NaPO₄; 150 mM NaCl)

PBS diene, wenn nichts anderes angegeben wird, generell als Lösungsmittel für C3.

Veronal-gepufferte Kochsalzlösung mit Saccharose (VBS-Saccharose)

Ansatz zur Saccharose-Stammlösung:

D (-) Saccharose 486,1 g

Na-5,5-Diäthylbarbiturat 5,095 g

Aqua dest. ad. 1000 ml

Die Saccharose wird zuerst in 500 ml Aqua dest aufgen~~o~~mmen und bei 70° C in Lösung gebracht. Nach Abkühlung wird mit einer 2 n HCl pH 7,3 eingestellt, und dann wird auf 1 l mit Aqua dest. aufgefüllt.

Ansatz der VBS-Stammlösung:

NaCl	88,3 g
Na-5,5-Diäthylbarbiturat	10,16 g
1 n NaCl	34,58 ml
Aqua dest.	ad. 2000 ml

Mit der 1 n HCl wird die Lösung auf pH 7,3 und mit NaCl auf 35 ms eingestellt. Zur Erstellung des VBS-Saccharose-Puffers wurden 1,5 g Gelatine in 50 ml Aqua dest. bis zur Lösung erhitzt und dann abgekühlt; dazu wurden 240 ml Saccharose-Stammlösung und 160 ml VBS-Stammlösung addiert. Abschließend wurden 1 ml CaCl_2 -Lösung (0,3 M) und 1 ml MgCl_2 -Lösung (2,0 M) hinzugegeben und der Ansatz mit Aqua dest. auf 2000 ml aufgefüllt.

Alsever-Lösung:

Hierzu wurden 20,5 g D (+)-Glukose, 7,92 g Na-Citrat x H_2O , 4,2 g Natriumchlorid und 0,55 g Zitronensäure zusammengegeben. Das Ganze wurde dann mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt und mit 0,1 n HCl auf einen pH von 6,1 und mit NaCl auf 11,2 ms eingestellt. Letztlich wurde die Lösung mit einem Seits-Filter (EKSI) sterilisiert.

Borat-Puffer:

Lösung A: Borsäure (krist.) 0,2 M (12,49 g/1000 ml H_2O);

Lösung B: Dinatriumtetraborat-10-hydrat (krist.) 0,2 M (19,05 g/1000 ml H_2O). Um einen Borat-Puffer mit dem pH 8,6 und eine Molarität von 0,2 zu erhalten, mußte man von Lösung A 450 ml und von Lösung B 550 ml mischen.

Natrium-Phosphat-Puffer:

Lösung A: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$; 0,2 M (27,6 g/1000 ml);

Lösung B: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$; 0,2 M (71,64 g/1000 ml)

Um einen Natriumphosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7 und einer Molarität von 0,1 zu bekommen, mußte ich 195 ml von Lösung A, 305 ml von Lösung B und 500 ml H_2O zusammengeben.

1.3. Kulturmedien

Minimum essential Medium, Eagle (MEM)

Dieses Medium wurde von Flow-Laboratories (Bonn, Kat.-Nr.: 1-024M) bezogen. Für unsere Ansätze wurde dieses Medium immer mit BSA (0,3 mg %) angereichert.

Fetales Kälberserum (FCS)

Vor Gebrauch wurde das FCS 30 Minuten bei 56°C inkubiert und dadurch inaktiviert (Flow-Laboratories, Bonn, Kat.-Nr.: 4-055 D).

2. Verwendete C3-Präparate

2.1. Humanes C3

2.1.1. Natives C3

Der Großteil des verwendeten, nativen C3 wurde nach der Methode von Tack und Prahl (133) gereinigt. Einige C3-Chargen (Pool S IX) wurden ohne Polyäthylenglykolfällung nach dem Verfahren von Nilsson, U.R. und Müller-Eberhard, H.J. (104) erstellt. Die C3-Präparate wurden mir zur Verfügung gestellt.

2.1.2. Modifiziertes C3

Natives C3 wurde hier unter den verschiedensten Bedingungen modifiziert. Bei den Tests wurde jeweils von der gleichen C3-Lösung (4 mg/ml PBS) ausgegangen:

a) Erhitzung

Das native C3 wurde hier in einem unterschiedlich temperierten Wasserbad 15 Minuten inkubiert. Die Behandlung erfolgte mit Temperaturen von 62° C und 100° C. Bei den beiden Temperaturen fiel das ohne Polyäthylenglykol präparierte C3 aus und konnte für die Bindungsstudien bzw. Rosettentests nicht mehr verwendet werden.

b) Natriumthiocyanat (NaSCN)

Hier wurde das C3 mit einer 2 M Natriumthiocyanatlösung 15 Minuten bei 37° C inkubiert (400 ul C3-Lösung + 100 ul 10 M NaSCN-Lösung in PBS). Anschließend wurde das NaSCN-Gemisch 36 Stunden gegen PBS dialysiert. Durch die Behandlung der C3-Lösung mit dem entsprechenden Volumen der 10 m NaSCN-Lösung sank die C3-Konzentration von 4,0 mg/ml auf 3,2 mg/ml.

c) Kaliumbromid

500 ul einer 5 M Kaliumbromid-Lösung wurden mit 500 ul C3-Lösung 15 Minuten inkubiert und anschließend 36 Stunden gegen PBS dialysiert. Die Konzentration des Proteins nach Denaturierung im Ansatz betrug 2 mg C3/ml.

d) Harnstoff

Von einer 5 M-Harnstofflösung in PBS wurden 250 ul zu 500 ul einer C3-Lösung gegeben. Dadurch sank die Proteinkonzentration im C3-Präparat von 4 mg/ml auf 2,7 mg/ml. Nach 15-minütiger Inkubation bei 37° C wurde der Harnstoff-C3-Ansatz 36 Stunden gegen PBS dialysiert.

e) Reduktion und Alkylierung mit 1 M-Mercaptoäthanol- und 1 M Jodacetamidlösung

Dazu stellte ich mir eine 3 M Mercaptoäthanol- und eine 3 M Jodacetamidlösung (beides in PBS) her. Zu 400 ul einer C3-Lösung gab ich 200 ul der 3 M Mercaptoäthanol- und 200 ul der 3 M Jodacetamidlösung. Nach 15 Minuten Inkubation bei 37° C gab ich zu diesen 600 ul 300 ul der 3 M-Jodacetamidlösung. Das heißt, daß die C3-Konzentration von 4 mg/ml auf 1,8 mg/ml absank. Danach wurde der ganze Ansatz gegen PBS dialysiert.

f) HCl und NaOH (pH 2 bzw. pH 12)

Hier wurde die Titration des pH-Wertes auf pH 2 bzw. pH 12 mit 0,1 n HCl bzw. 0,1 n NaOH durchgeführt; dann wurde die Lösung 15 Minuten bei dem entsprechenden pH-Wert und bei 37° C inkubiert und anschließend auf einen pH-Wert von 7,4 mit der 0,1 n HCl bzw. 0,1 n NaOH rücktitriert.

g) Bestrahlung mit Gamma-Strahlen

Die Bestrahlung der C3-Proben mit dem Telekobaltgerät der Universitätsstrahlenklinik Mainz wurde freundlicherweise von Herrn Professor Kutzner durchgeführt.

Um die unterschiedlichen Strahlendosen zu erreichen, wurden die Proben mit einer konstanten Dosis über eine verschieden lange Zeit bestrahlt. Im einzelnen wurden die C3-Proben (1 ml mit 4 mg C3/ml PBS) mit 1 rad (0,01 Gy), 10 rad (0,1 Gy), 100 rad (1 Gy), 200 rad (2 Gy) und 1000 rad (10 Gy) bestrahlt.

2.2. Humanes C3b

Gereinigtes C3 wurde nach der Methode von Bokisch et al. (7) in C3a und C3b gespalten.

Ansatz:

1 ml Trypsin (400 ug/ml) vorgewärmt auf 27° C
+ 3 ml C3 (3 mg/ml)

Dieser Ansatz wurde eine Minute bei 27° inkubiert. Danach wurden 1,2 ml Trypsininhibitor (1,2 mg)

hinzugegeben, um die Reaktion zu stoppen.

2.3. Meerschweinchen-C3b

Es wurden gereinigtes C3 (Geschenk von Herrn Professor Dr. Bitter-Suermann) verwendet, das nach Mc Conahey und Dixon (86) mit ^{125}J -Na markiert wurde. Die Spaltung in C3a und C3b und die anschließende Trennung in zwei Fraktionen wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Meuer vorgenommen (89).

3. Zellen

3.1. Raji-Zellen

Die benutzten Raji-Zellen entnahm ich während der mittleren logarithmischen Wachstumsphase ($5-8 \times 10^6$ Zellen/ml) einer Kultur unseres Labors. Die Zellen stellen humane Langzeitlinien dar, die von einem Burkitt-Lymphom abstammen. Die Raji-Zellen wurden nur dann zu Versuchen eingesetzt, wenn sie eine Viabilität von mindestens 90 % (Bestimmung mit Trypanblau) und eine Rosettenbildungsfähigkeit von 75 % hatten. Die Rosettenbildungsfähigkeit der Raji-Zellen schwankte zwischen 75 % und 90 %.

3.2. Glutarisierte Raji-Zellen

Die Raji-Zellen wurden glutarisiert, indem ich sie 15 Minuten bei 37°C in einer 0,02 %igen Glutaraldehydlösung (in PBS) inkubierte. Anschließend wurden 0,75 mg L-Lysin pro ml Inkubationslösung (0,4

M) addiert und die Zellen nach einer Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur dreimal in MEM-BSA gewaschen.

3.3. Humane Erythrozyten der Blutgruppe O

Die Erythrozyten wurden uns von der Blutbank der Universitätsklinik Mainz zur Verfügung gestellt.

3.4. Tannisierte Schafserythrozyten (E^{S-tan})

Zur Tannisierung wurde 5 %ige Tanninsäure in physiologischer Kochsalzlösung (2,5 g in 50 ml) fünf Minuten bei $56^{\circ} C$ inkubiert. Danach wurde diese Lösung 1:1000 in physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Ein Volumen dieser Tanninlösung wurde mit einem Volumen 2,5 %iger Schafserythrozytensuspension (5×10^8 -Zellen pro ml = 2,5 %) 10 Minuten bei $37^{\circ} C$ inkubiert. Anschließend wurden die E^{S-tan} in PBS gewaschen, bis keine Lyse mehr auftrat. Danach wurde die Ausgangskonzentration von 5×10^8 -Zellen pro ml mit PBS wieder eingestellt. Die Reaktion wurde in Glasgefäßen durchgeführt, da in Plastikgefäßen die Ergebnisse gelegentlich nicht reproduzierbar waren.

3.5. C3-Beladung tannisierter Schafserythrozyten

Die E^{S-tan} wurden mit drei verschiedenen C3-Konzentrationen in Glasgefäßen inkubiert (1,5 mg C3/ml; 3,0 mg C3/ml; 6,0 mg C3/ml). Es wurden immer

gleiche Volumina C3-Lösungen zu gleichen Volumina E^S-tan (5×10^8 -Zellen pro ml) addiert. Die Inkubationszeit belief sich auf 12 Stunden bei 4° C und anschließend 20 Minuten bei 37° C. Abschließend wurde dreimal in PBS gewaschen und der Ansatz auf $1,3 \times 10^8$ Zellen pro ml eingestellt.

4. Markierung von C3 mit ^{125}J

4.1. Markierung von C3 mit $^{125}\text{J-Na}$

Diese Markierung von C3 bzw. C3b mit $^{125}\text{J-Na}$ wurde nach der von Mc Conahey und Dixon (86) angegebenen Methode durchgeführt.

Zu 1 ml 0,12 M Na-PO₄ (pH 7,0) wurden 50 ul $^{125}\text{J-Na}$ (500 uCi) gegeben. Anschließend wurden die 50 ul 0,1 n NaOH, in denen das $^{125}\text{J-Na}$ gelöst war, mit 50 ul 0,1 n HCl neutralisiert (Kontrolle mit pH-Papier). Weiter wurden 1 ml einer C3-Lösung (3,5 mg/ml), 1,55 ml 0,15 M Na-PO₄ (pH 7,0) sowie 0,350 ml ChloraminT (100 ug/ml H₂O) addiert. Dialysiert wurde 2 x 24 Stunden gegen jeweils 2000 ml PBS (+ 0,03 % NaN₃)

Wichtig bei der Markierung war, daß nicht mehr als 100 µg Chloramin T pro mg C3 eingesetzt wurden, da sonst eine Denaturierung des C3 zu erwarten war.

Mit dieser Markierungsmethode ergab sich oftmals eine unterschiedliche spezifische Aktivität des C3. Diese Tatsache zwang uns dazu, bei den einzelnen Versuchen ein unterschiedlich großes C3-Angebot zu verwenden, um bei der Auswertung der Tests überhaupt in meßbare Bereiche zu kommen.

4.2. Markierung mit Bolton-Hunter-Reagenz

Die Markierung mit der Bolton-Hunter-Reagenz (NEN, Dreieichhein, BRD, Best.-Nr.: 11208) wurde nach der Methode von Bolton und Hunter (8) vorgenommen. Wichtig ist dabei, daß äquimolare Mengen an Protein und Reagenz bei der Markierung verwendet werden.

0,6 ml Bolton-Hunter-Reagenz entsprachen 1 mCi und waren gleich $6,6 \times 10^{-7}$ mM. Unser C3-Präparat enthielt 0,750 mg C3/ml, was $3,95 \times 10^{-6}$ mM C3/ml entspricht.

Ansatz:

0,3 ml Bolton-Hunter-Reagenz ($3,3 \times 10^{-7}$ mM entsprechend 500 uCi) wurden mit 0,1 ml C3 ($3,95 \times 10^{-7}$ mM gleich 75 ug C3) versetzt. Dem Reaktionsmedium wurde noch 0,1 ml Borat-Puffer (0,2 M, pH 8,6) zugefügt, um den pH-Wert bei 8,6 zu stabilisieren. Die Inkubation erfolgte bei 0° C für 15 Minuten.

Der ganze Ansatz wurde 2 x 24 Stunden gegen jeweils 200 ml PBS (+ 0,03 % NaN_3) dialysiert.

5. Proteinbestimmung nach Lowry (76)

<u>Reagenzien:</u>	1) Natriumcarbonat	0,189 M (20,03 g/1000 ml H_2O)
	2) Kupfersulfat	0,04 M (0,1 g/1000 ml H_2O)
	3) K-Na-Tatrat	0,071 M (18,1 g/1000 ml H_2O)
	4) Folin-Ciocalteus-Reagenz	(45,45 ml ad. 100 ml mit Aqua dest. verdünnt ergibt eine 1 n-Säure).

1. Ansatz (täglich frisch):

Hierbei wird 1 ml Kupfersulfat-Lösung und 1 ml Tatrat-Lösung gemischt und mit Natrium-Carbonat auf 100 ml aufgefüllt.

2. Ansatz:

0,1 ml Proteinlösung werden mit 2,0 ml des ersten Ansatzes 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 ml Folin-Reagenz (1 n Säure) wird weitere 30 Minuten bei 37°C inkubiert und dann die optische Dichte bei 660 nm bestimmt. Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt anhand einer Standardkurve, aufgestellt mit eingewogenem BSA.

6. Bindungstests mit Raji-Zellen und humanen Erythrozyten

6.1. Grundansätze

6.1.1. Bindungsstudien mit Raji-Zellen

Bei den einzelnen Ansätzen der Bindungsstudien wurde immer ein konstantes Volumen von 200 μ l eingesetzt. Die Menge der eingesetzten Raji-Zellen war immer konstant (100 μ l bei einer Konzentration von 1×10^6 Zellen ml/MEM-BSA). Die restlichen 100 μ l wurden durch unterschiedliche Mengen $^{125}\text{J-C3}$ bzw. MEM-BSA repräsentiert (Variation, s. unter 6.2.). Nach der Zusammenstellung des 200 μ l-Volumens wurde die Radioaktivität gemessen (gleich dem C3-Angebot). Dann wurde 30 Minuten bei 4°C inkubiert (Veränderungen, s. 6.2.). Anschließend wurden die Raji-Zellen dreimal mit MEM-BSA und zweimal mit konzentriertem, fetalem Kälberserum (inaktiv) gewaschen. Bei der Waschung mit fetalem Kälberserum wurde das abzentrifugierte Pellet jedesmal in ein neues Eppendorfhütchen umpipettiert. Abschließend wurde die Menge des an die Raji-Zellen gebundenen, markierten C3 anhand der Impulse pro Minute in einem Meßgerät (Best.-Nr.: BF 1017-2) der Firma Berthold (Wilbad) bestimmt. Dabei handelte es sich um einen NaJ-Bohrlochzähler, dessen Nullwert bei 70 Impulsen pro Minute lag.

6.1.2. Bindungsstudien mit humanen Erythrozyten (Blutgruppe 0)

Das heparinisierte Vollblut wurde sechsmal in Ringerlösung gewaschen und der Überstand abgesaugt. Danach wurden die Erythrozyten in Alsever-Lösung (Konzentration 5×10^5 Zellen/ml) aufgenommen, in der sie sich 6 Tage bei 4°C lagern ließen.

Bei den einzelnen Ansätzen wurde ein Volumen von 200 μl eingesetzt. Ein Teil (100 μl) bestand aus einer Erythrozytenaufschwemmung mit einer Konzentration von 5×10^6 Zellen MEM-BSA. Im übrigen wurde so verfahren wie in Absatz 6.1.1. beschrieben.

6.2. Variation der Reaktionsbedingungen

Die Veränderung der Bedingungen, unter denen die Reaktion zwischen C3 und C3-Rezeptor ablief, war bei den Versuchen mit Raji-Zellen und Erythrozyten gleich, weshalb dieser methodische Teil hier gemeinsam abgehandelt wird.

6.2.1. Veränderung der Inkubationstemperatur

Hierbei wurden bei einer feststehenden Inkubationszeit Temperaturen von 4°C , von 20°C und von 37°C durch das entsprechende Wasserbad realisiert.

6.2.2. Verdünnung von $^{125}\text{J-C3}$

Im Versuchansatz a sollte das $^{125}\text{J-C3}$ in einer Konzentration von 1:16, in b 1:32, in c 1:64, in d 1:128 und d 1:256 den Zellen angeboten werden. Dazu wurden in Ansatz a 750 μl MEM-BSA und 50 μl $^{125}\text{J-C3}$ gemischt und für b bis e jeweils 400 μg MEM-BSA bereitgestellt. Nach Überpipettieren von jeweils 400 μl erhielt ich die gewünschte Konzentration, die sich in mg/ml durch die Radioaktivität des jeweiligen Ansatzes bestimmen ließ.

6.2.3. Zeitkinetik

Bei dieser Modifikation wurde nach einer Inkubation der Zellen mit C3 für eine Zeit von 60, 54, 30, 15, 5 Minuten bzw. 45, 20 und 5 Sekunden der Versuchsablauf fortgesetzt.

6.2.4. Veränderung des pH-Wertes des Inkubationsmediums

Die Einstellung des pH-Wertes wurde entweder mit 0,1 n NaOH oder durch Äquilibrierung mit CO_2 vorgenommen. Dabei wurde das Milieu von pH 6,5 über pH 7,0, pH 7,5, pH 8 bis pH 8,5 variiert. Die 100 μl Zell-

suspension wurde zentrifugiert und das Pellet in 100 μ l der Lösung mit dem entsprechenden pH-Wert pipettiert.

6.3. Vergleich verschiedener C3-Präparate

6.3.1. Anlagerung von Meerschweinchen C3 und C3b

Bei diesem Ansatz wurde das Meerschweinchen C3 und C3b in unterschiedlichen Mengen den Raji-Zellen und humanen Erythrozyten in der unter 6.1. angegebenen Art und Weise angeboten.

6.3.2. Anlagerung des C3b human

C3b wurde hier wie C3 in unterschiedlichen Mengen angeboten und die Bindungskurve bestimmt (s. a. 6.1.).

6.3.3. Veränderung der Salzkonzentration im Medium

Die Variation wurde durch folgende Ansätze erreicht:

- | | |
|--------------------------|----------------|
| a) 2,5 ml MEM-BSA | |
| + 2,5 ml 0,3M Saccharose | = 0,077 M NaCl |
| b) 5 ml MEM-BSA | = 0,154 M NaCl |
| c) 4,5 ml MEM-BSA | |
| + 0,5 ml 1M NaCl | = 0,254 M NaCl |
| d) 5 ml MEM-BSA | |
| + 1 ml 2M NaCl | = 0,484 M NaCl |
| e) 4,5 ml MEM-BSA | |
| + 1,5 ml 2M NaCl | = 0,654 M NaCl |

Auch hier wurde das Zellpellet der 1×10^5 Raji-Zellen bzw. 5×10^5 Erythrozyten in 100 μ l der entsprechenden Lösung aufgenommen. Der Versuchsansatz a bis e bestand aus 100 μ l Zellen (in MEM-BSA mit der jeweiligen Ionenkonzentration a bis e) 75 μ l Medium mit der entsprechenden Ionenkonzentration und 25 μ l $^{125}\text{J-C3}$ (in PBS).

6.4. Veränderung der Zellmembranen

6.4.1. Durch unterschiedliche Novocainkonzentrationen

Hier hatte der ansonsten typische Ansatz a) eine Novocainkonzentration von 3×10^{-2} M, b) 3×10^{-3} , c) 3×10^{-4} , d) 3×10^{-5} M; Ansatz e) wurde ohne Novocainzugabe ausgeführt.

6.4.2. Durch Diisopropylfluorophosphat (DFP)

Zuerst wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von DFP die maximale Konzentration getestet, bis zu welcher die Raji-Zellen intakt blieben. Dazu inkubierten die 1×10^5 Raji-Zellen in 100 μ l unterschiedlich konzentrierter (5, 1, 0,5, 0,1 mM) DFP-Lösungen. Diese Inkubation dauerte 20 Minuten bei 37°C . Da die Zellen bei Behandlung mit einer 1 mM-DFP-Lösung vital blieben, wurde nach Vorinkubation der Raji-Zellen mit dieser DFP-Lösung die Bindungsstudie in der typischen Weise durchgeführt.

Ansatz:

- | | |
|--|---|
| a) 100 ul Raji-Zellen
(1 x 10 ⁵ Zellen in MEM-BSA) | + 100 ul ¹²⁵ J-C3 |
| b) " | + 50 ul ¹²⁵ J-C3
+ 50 ul MEM-BSA
(0,3 %) |
| c) " | + 20 ul ¹²⁵ J-C3
+ 80 ul MEM-BSA
(0,3 %) |
| d) " | + 10 ul ¹²⁵ J-C3
+ 90 ul MEM-BSA
(0,3 %) |

Der gleiche Ansatz wurde zur Kontrolle auch mit Raji-Zellen durchgeführt, die nicht mit DFP behandelt worden waren.

6.4.3. Bindungsstudie mit Raji-Zellen, die glutarisiert und mit DFP vorbehandelt worden waren

Glutarisierte Raji-Zellen (s. 3.2.) wurden mit 1mM DFP 15 Minuten vorbehandelt. Der Versuchsansatz entsprach dem in 6.4.2.

7. Berechnung der Bindungskonstante

(Ableitung der Scatchard-Gleichung für n voneinander unabhängige Bindestellen (66, 117, 122)).

Ro: molare Gesamtkonzentration an Rezeptoren

Zo: molare Gesamtkonzentration an Zellen

L̄: molare Konzentration an freien Liganden

R̄: molare Konzentration an freien Rezeptoren

Lo: molare Konzentration an angebotenen Liganden

$\overline{RL}$: molare Konzentration an gebundenen Liganden

n: Zahl der Rezeptorbindestellen pro Zelle

Kass: Assoziationskonstante

Die molare Gesamtkonzentration an Rezeptoren im Ansatz ergibt sich durch Multiplikation der molaren Gesamtkonzentration an Zellen mit der Zahl der Rezeptorbindestellen pro Zelle.

$$R_o = n \times Z_o \quad (1)$$

Die molare Konzentration an angebotenen Liganden setzt sich aus der molaren Konzentration an freien Liganden und der molaren Konzentration an gebundenen Liganden zusammen.

$$L_o = \bar{L} + \overline{RL} \quad (2)$$

Die Assoziationskonstante wird aus dem Quotienten molare Konzentration an gebundenen Liganden zu molare Konzentration an freien Liganden multipliziert mit der molaren Konzentration an freien Rezeptoren bestimmt.

$$Kass = \frac{\overline{RL}}{L \times R} \quad (3)$$

Die molare Konzentration an freien Rezeptoren läßt sich aus der molaren Gesamtkonzentration an Rezeptoren minus der molaren Konzentration an gebundenen Liganden errechnen.

$$\bar{R} = R_o - \overline{RL} \quad (4)$$

$$\text{aus 1 in 4 } \bar{R} = n \times Z_o - \overline{RL} \quad (5)$$

$$\text{aus 5 in 3: Kass} = \frac{\overline{RL}}{(n \times Z_0 - \overline{RL} \times \overline{L})}$$

Nach Erweiterung von RL im Nenner mit Z_0 und Ausklammern von Z_0 ergibt sich für Kass

$$\text{Kass} = \frac{\overline{RL}}{Z_0 \times (n - \frac{\overline{RL}}{Z_0}) \times \overline{L}} = \frac{\overline{RL} / Z_0}{(n - \frac{\overline{RL}}{Z_0}) \times \overline{L}} \quad (6)$$

Der mittlere Sättigungsgrad ist definiert als

$$\overline{V} = \frac{\overline{RL}}{Z_0} \quad (7)$$

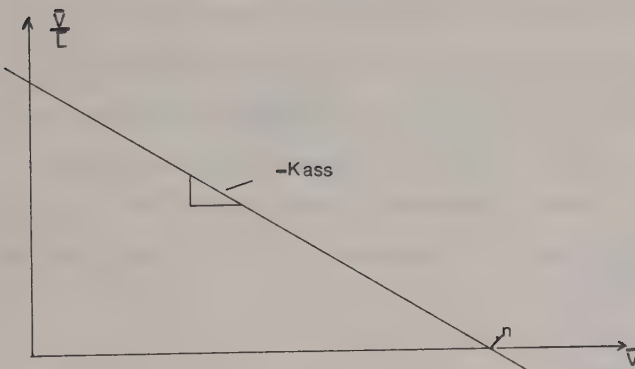
aus 7 in 6

$$\text{Kass} = \frac{\overline{V}}{(n - \overline{V}) \times \overline{L}} \quad (8)$$

Nach Umformung von (8) erhält man die Scatchard-Gleichung:

$$\frac{\overline{V}}{\overline{L}} = - \text{Kass} \times \overline{V} + \text{Kass} \times n$$

Auftragung des Scatchard-Plots:



für $y = 0$ ist $X(0) =$

$$0 = - \text{Kass} \times X(0) + \text{Kass} \times n$$

$$\text{Kass} \times X(0) = \text{Kass} \times n$$

$$X(0) = n$$

Die Steigung der Geraden ist gleich - Kass.

8. Hemmung der Rosettenbildung von Lymphozyten mit $\text{EA}^{\text{gl}}\text{C}^{\text{hum}}$ durch C3

Zum Ansatz des Rosettentests wurden 100 μl Raji-Zellen (1×10^6 Raji-Zellen pro ml MEM-BSA) 20 Minuten bei 37°C mit 400 μl einer C3-Lösung (Menge des eingesetzten, nativen C3, s. 8.1.) inkubiert. Dazu wurden 100 μl $\text{EA}^{\text{gl}}\text{C}^{\text{hum}}$ (5×10^7 Zellen/ml PBS) gegeben. Anschließend wurde bei 37°C 20 Minuten end-über-end rotierend inkubiert. Während der Aufbewahrung des Ansatzes bei 4°C konnte man die Rosetten auszählen (unter Rosetten verstanden wir Lymphozyten, die mit mindestens 3 Erythrozyten beladen waren).

Bei jedem Ansatz wurde zur Beurteilung der Rosettenbildungsfähigkeit der $\text{EA}^{\text{gl}}\text{C}^{\text{hum}}$ mit den Lymphozyten ein Wert erstellt, bei dem PBS anstatt C3 zu den Zellen gegeben wurde.

Herstellung der $\text{EA}^{\text{gl}}\text{C}^{\text{hum}}$: Zur Beladung der Schafserythrozyten mit Antikörpern wurde käuflicher Ambozeptor verwendet. Gleiche Volumina von 1:240 in VBS-Saccharose verdünntem Ambozeptor und dreimal in VBS-S gewaschene Schafserythrozyten ($1 \times 10^9/\text{ml}$) wurden gemischt und für 20 Minuten bei 37°C laufend geschüt-

telt. Danach wurden die antikörperbeladenen Zellen erst in VBS-EDTA, dann in VBS und schließlich zweimal in VBS-S gewaschen und auf 5×10^8 Zellen pro ml in VBS-S eingestellt. Gleiche Volumina antikörperbeladener Erythrozyten und Glutaraldehydlösung (0,6 %ig, pH 7,5) in VBS-S wurde für 15 Minuten bei 20°C zum Reagieren gebracht. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen wieder im doppelten Ausgangsvolumen VBS-S ($2,5 \times 10^8$ ml) suspendiert. Dazu wurde dasselbe Volumen einer 0,5 M L-Lysinhydrochloridlösung (Lysinhydrochlorid in VBS-S gelöst und genau auf pH 7,4 eingestellt) gegeben und die Mischung 15 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Daraufhin wurden die Zellen zweimal in VBS-S gewaschen und auf $5 \times 10^8/\text{ml}$ in VBS-S verdünnt. Die auf $5 \times 10^8/\text{ml}$ eingestellten Zellen wurden dann mit einem Volumen Humanserum (1:2 in PBS verdünnt) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und danach viermal in PBS gewaschen. Danach waren die mit Antikörpern und Komplement beladenen Zellen ($\text{EA}^{\text{gl}} \text{C}^{\text{hum}}$) gebrauchsfertig.

8.1. Ansätze der Rosettenhemmtests mit vorbehandeltem C3

Die vier Ansätze zum Rosettenhemmtest mit Kaliumbromid-denaturiertem C3 lauteten:

- | | |
|--|--|
| a) 100 μl Raji-Zellen
(1×10^5 Zellen in MEM-BSA) | + 400 μl PBS - (KBR) |
| b) " | + 100 μl C3 in PBS
(= 200 μg)
+ 300 μl PBS |
| c) " | + 200 μl C3 in PBS
(= 400 μg)
+ 200 μl PBS |
| d) " | + 400 μl C3 in PBS
(= 800 μg) |

Im Ansatz a wurde der Rosettenhemmtest mit einer ursprünglich 2,5 M KBR-PBS-Lösung, die 36 Stunden gegen PBS dialysiert worden war, durchgeführt, um den Einfluß der Restkonzentration von KBR auf den Rosettenhemmtest zu testen.

8.1.2. Mercaptoäthanol- und jodacetamidbehandeltes C3

In diesem Fall lauteten die 4 Ansätze des Rosettenhemmtests:

- | | |
|---|--|
| a) 100 ul Raji-Zellen
(1×10^5 Zellen in MEM-BSA) | + 400 ul PBS (Mercaptoäthanol und Jodacetamid) |
| b) " | + 100 ul C3 in PBS
(= 200 ug) + 300 ul PBS |
| c) " | + 200 ul C3 in PBS
(= 400 ug) + 200 ul PBS |
| d) " | + 400 ul C3 in PBS
(= 800 ug) |

Im Ansatz a wurde die Restkonzentration von Jodacetamid und Mercaptoäthanol in Denaturierungskonzentrationen nach 36-stündiger Dialyse gegen PBS auf ihre Beeinflussung bezüglich der Rosettenbildung getestet.

8.1.3. Harnstoffbehandeltes C3

Die Ansätze lauteten hier:

- | | |
|--|---|
| a) 100 ul Raji-Zellen
(1 x 10 ⁵ Zellen in MEM-BSA) | + 400 ul PBS (Harnstoff) |
| b) " | + 75 ul C3 in PBS
(= 200 ug) + 325 ul PBS |
| c) " | + 150 ul C3 in PBS
(= 400 ug) + 250 ul PBS |
| d) " | + 300 ul C3 in PBS
(= 800 ug) + 100 ul PBS |

Ansatz a wurde hier aus denselben Gründen gemacht wie in 8.1.2.

8.1.4. Durch Bestrahlung behandeltes C3

Das mit unterschiedlichen Dosen bestrahlte C3 wurde jeweils mit folgendem Versuchsansatz im Rosettenhemmtest getestet:

- | | |
|--|---|
| a) 100 ul Raji-Zellen
(1 x 10 ⁵ Zellen in MEM-BSA) | + 400 ul PBS |
| b) " | + 40 ul C3 in PBS
(= 200 ug) + 360 ul PBS |
| c) " | + 80 ul C3 in PBS
(= 400 ug) + 320 ul PBS |
| d) " | + 160 ul C3 in PBS
(= 800 ug) + 240 ul PBS |

Im Ansatz a wurde der eingesetzte PBS mit der gleichen Dosis bestrahlt wie das in der Versuchsreihe getestete C3.

8.1.5. Hitzebehandeltes C3

Das mit 62° C und 100° C denaturierte C3 wurde wie folgt eingesetzt:

- a) 100 ul Raji-Zellen + 400 ul PBS
(1 x 10⁵ Raji-Zellen in MEM-BSA)
- b) " + 50 ul C3 in PBS
(= 200 ug) + 350 ul PBS
- c) " + 100 ul C3 in PBS (= 400 ug) + 300 ul PBS
- d) " + 200 ul C3 in PBS (= 800 ug) + 200 ul PBS

Das in Ansatz a eingesetzte PBS wurde vor Versuchsbeginn ebenfalls auf 62° C und 100° C erwärmt.

8.1.6. Mit pH 2 und pH 12 behandeltes C3

Der Ansatz, mit dem die beiden auf verschiedene Art und Weise denaturierten C3-Chargen getestet wurden, entsprach dem in 8.1.5. In Ansatz a wurden 400 ul PBS eingesetzt, das den Titrationsvorgang auf pH 2 bzw. pH 12 und die Rücktitration auf pH 7 mitgemacht hatte und auch 36 Stunden gegen unbehandeltes PBS dialysiert worden war.

8. 2. Vergleichsrosettentest mit nicht denaturiertem C3

Der Ansatz zu diesem Test lautete:

- | | |
|--|--|
| a) 100 ul Raji-Zellen
(1 x 10 ⁵ Zellen in MEM-BSA) | + 400 ul PBS |
| b) " | + 50 ul C3 (= 200
ug) in PBS + 350 ul
PBS |
| c) " | + 100 ul C3 (= 400
ug) in PBS + 300 ul
PBS |
| d) " | + 200 ul C3 (= 800
ug) in PBS + 200 ul
PBS |

9. Bindungsstudie unter Verwendung von vorbehandeltem C3

Der Ansatz zu den einzelnen Tests wurde genauso durchgeführt wie unter 6.1.1. für natives C3 beschrieben. Das C3 wurde mit Kaliumbromid, Harnstoff, Mercaptoäthanol oder Jodacetamid vorinkubiert bzw. mit Hitze oder γ -Strahlen vorbehandelt (s. 2.1.2.).

10. Anlagerung von ¹²⁵J-C3 an E^{s-tan}-C3

Die E^{s-tan}-C3 wurden in einer Konzentration von 5 x 10⁶ Zellen pro ml MEM-BSA eingesetzt. Der Ansatz lautete:

- | | |
|---|-------------------------------------|
| a) 100 ul E ^{s-tan} in MEM-BSA | + 100 ul ¹²⁵ J-C3 in PBS |
| b) " " " | + 75 ul " + 25 ul
MEM-BSA |
| c) " " " | + 50 ul " + 50 ul
MEM-BSA |
| d) " " " | + 25 ul " + 75 ul
MEM-BSA |

Inkubiert wurde hier wieder 30 Minuten bei 4° C. Danach wurde das C3-Angebot gemessen. Weiter wurde dreimal mit MEM-BSA und zweimal mit fetalem Kälberserum (inaktiv) gewaschen und anschließend die C3-Aufnahme gemessen.

E^{S-tan} wurden einmal ohne C3-Beladung angeboten; zum anderen wurden Chargen von E^{S-tan} verwendet, die mit C3-Lösungen von 1,5 mg C3/ml PBS, 3,0 mg C3/ml und 6,0 mg C3/ml vorinkubiert worden waren.

11. Aktivierung von Sepharose 4B, Inkubation mit C3 und Anlagerung von ¹²⁵J-C3

11.1. Aktivierung der Sepharose 4B und Inkubation mit C3

Die Sepharose 4B wurde mit dem 10-fachen Volumen eiskalten Wassers auf einer Fritte gewaschen. Anschließend wurde die Sepharose in einem gleichen Volumen H₂O aufgenommen und auf einen Magnetrührer gestellt. Nach Zugabe von 0,24 g (Cyanbromid) pro ml Sepharose wurde der Ansatz bei einem pH von 10,5 bis 11 (eingestellt durch Titration mit 3 M NaOH) und einer Temperatur zwischen 18 bis 20° C 15 bis 20 Minuten kräftig gerührt. Danach wurde die Sepharose auf einer Fritte abgesaugt und schnell mit dem 10-fachen Volumen eiskalten Wassers gewaschen.

Die so aktivierte Sepharose wurde dann mit unterschiedlichen C3-Konzentrationen (1,5 mg C3/ml,

3,0 mg C3/ml, 6,0 mg C3/ml) in 0,2 M Citratpuffer (pH 7,0) für 24 Stunden inkubiert.

Durch einen Vergleich der C3-Konzentration im Überstand der Inkubationslösung (Bestimmung der Extinktion bei 280 nm) und der Konzentration der eingesetzten C3-Lösung wurde dann der Prozentsatz der C3-Anlagerung an die Sepharose bestimmt (Kopplungseffizient ca. 90 %). Die C3-Sepharose wurde abschließend in folgender Reihenfolge gewaschen:

- 1) 4 Vol. H₂O
- 2) 4 Vol. 0,2 m Na-Bicarbonat
+ 0,5 m NaCl (pH 9,5)
- 3) 6 Vol. H₂O
- 4) 4 Vol. 0,25 M Na-Acetat (pH 4,3)
- 5) 4 Vol. PBS (pH 7,3)
- 6) 1 Vol. PBS + 0,01 % methyl. BSA

Verwendete Puffer:

- 1) 0,2 M Na-Citratpuffer (pH 7,0)
42,03 g Zitronensäure/l = 0,2 M
(mit 1 n NaOH auf pH 7,0 einstellen)
- 2) 0,2 M Na-Bicarbonatpuffer (pH 9,5)
16,8 g NaCl/l (0,2 M)
(mit 1 n NaOH auf pH 9,5 einstellen)
- 3) 0,25 M Na-Acetatpuffer (pH 4,3)
 - a) Essiglösung 0,25 M (336 ml)
 - b) Na-Acetatlösung 0,25 M (164 ml)

11.2. Anlagerung von $^{125}\text{J-C3}$ an Sepharose-C3

Ansatz:

- a) 100 μl Sepharose in PBS + 100 μl $^{125}\text{J-C3}$
- b) 100 μl Sepharose-C3 in PBS + 50 μl $^{125}\text{J-C3}$ + 50 μl PBS
- c) 100 μl Sepharose-C3 in PBS + 25 μl $^{125}\text{J-C3}$ + 75 μl PBS
- d) 100 μl Sepharose-C3 in PBS + 10 μl $^{125}\text{J-C3}$ + 90 μl PBS

Sepharose wurde in Ansatz a ohne C3-Beladung angeboten, in Ansatz b bis d wurden die in 11.1. beschriebenen Sepharose-Präparate verwendet.

12. Aufnahme der CD-(zirkularer Dichroismus) Spektren

Für die Aufnahme der CD-Spektren wurde der Cary 60-Spektropolarimeter mit CD-Zusatz (Firma Varian, Modell 6002) benützt. Für die Durchführung der Testung und der Auswertung danke ich Herrn Prof. Heidemann vom Institut für Eiweiß und Leder (TH Darmstadt).

Das Protein wurde in einer Küvette (Firma Helma) mit einer Dicke von 0,1 mm getestet. Die Konzentration des Proteins betrug 3,1 mg C3/ml PBS. Es wurden CD-Spektren für natives C3, für mit einer 2,5 M Kaliumbromidlösung-denaturiertes C3, für mit 200 rad und 1000 rad bestrahltes und für hitzedenaturiertes C3 aufgezeichnet.

Die Behandlung des C3 mit γ -Strahlen und mit Kaliumbromid ist in C.2.1.2. beschrieben. Bei der Hitzedenaturierung wurde natives C3 in der Küvette in ca. 10°C -Schritten von $25,5^\circ\text{C}$ bis 71°C erhitzt. Es wurden jeweils 30 Minuten bis zur exakten Einstellung der Temperatur gewartet.

Die CD-Signale wurden für 16 verschiedene Wellenlängen zwischen 300 und 200 nm aufgenommen. Aus den gewonnenen Werten ließen sich die Strukturanteile der Random-Coil-, der α -Helix und der β -Form in Prozent errechnen (11, 14, 153).

13. Aminosäureanalyse von nativem und mit 1000 rad bestrahltem C3 (98)

Die Aminosäureanalyse von C3 wurde mit dem Aminosäureanalysator LC 6000 (Biotronik, München) freundlicherweise von Herrn Prof. Heidemann (Institut für Eiweiß und Leder, TH Darmstadt) durchgeführt. Um das Protein in die einzelnen Aminosäureanteile zu zerlegen, wurde es 24 Stunden bei 110° C mit einer 6 n HCl-Lösung inkubiert. Aus den Gipfeln des Kurvenbildes, die der Aminosäureanalysator lieferte, konnte der prozentuale Anteil der einzelnen Aminosäuren eines Proteins berechnet werden.

D. Ergebnisse

1. Bindungsstudien mit nativem C3

Um unserem Ziel, der Bestimmung der Assoziationskonstante zwischen C3 und C3-Rezeptor und der Bestimmung der Anzahl der Bindestellen auf Raji-Zellen und humanen Erythrozyten gerecht zu werden, mußten wir zuerst die Anlagerungsscharakteristika zwischen nativem C3 und den erwähnten Zellen anhand von Bindungsstudien aufzeichnen.

1.1. C3-Anlagerung an Raji-Zellen

1.1.1. Einfluß der Inkubationszeit auf die Anlagerung von C3 an Raji-Zellen

Um festzustellen, in welcher Zeit die Raji-Zellen die maximale C3-Menge aufnahmen, variierten wir die Inkubationszeit bei gleichbleibendem C3-Angebot (Abb. 1). Von den angebotenen 5,86 μg C3 (1 μg entspricht $6,4 \times 10^4$ IPM) war nach einer Inkubationszeit von 5 Sekunden 1,4 %, nach 20 Sekunden 1,6 % und nach 45 Sekunden 1,9 % von den 1×10^5 Raji-Zellen aufgenommen worden. Die 2,4 ige Aufnahme nach fünfminütiger Inkubationszeit ließ sich dann nicht mehr steigern. In den späteren Tests wurde eine Inkubationszeit von 30 Minuten gewählt. Die im Vergleich zu den Versuchen 1.1.2. relativ größere C3-Menge, die hier von 1×10^5 Raji-Zellen aufge-

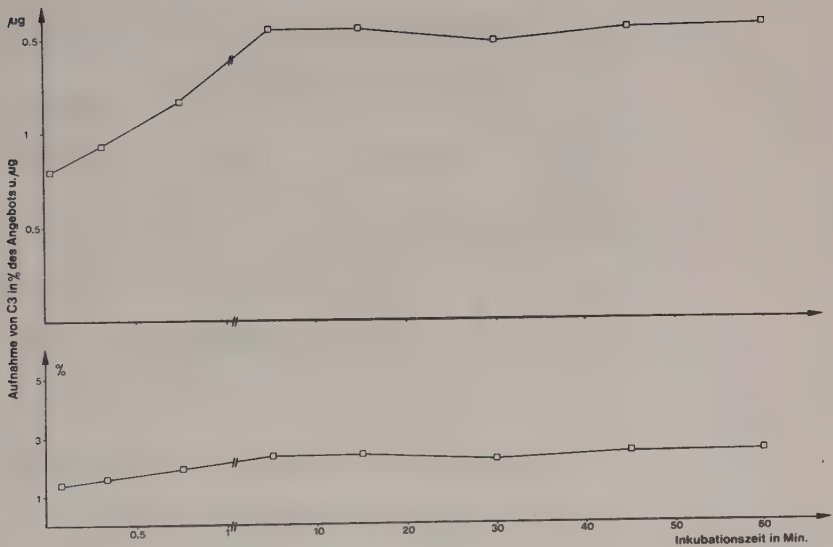


Abb. 1:

Einfluß der Inkubationszeit auf die C3-Anlagerung an Raji-Zellen

nommen wurde (2,4 % bei ausreichender Inkubationszeit), läßt sich wohl durch die bei diesem Versuch besonders hohe Rosettenbildungsfähigkeit der eingesetzten Raji-Zellen (92,6 %) erklären.

1.1.2. Dosisabhängige C3-Anlagerung an Raji-Zellen und Einfluß der Inkubationstemperatur

Die spezifische Aktivität des C3 betrug hier $6,4 \times 10^4$ IPM pro μg C3. Zuerst wurde die Anlagerung bei einer Inkubationstemperatur von 4°C (Abb. 2) untersucht. Bei einem Angebot zwischen 3,02 μg C3 bis 66,11 μg C3 ergab sich eine stetige Zunahme der Bindung an die Lymphoidzellen. Die Aufnahme (d. h. die gebundene C3-Menge) erreichte bei einem Angebot von 3,02 μg C3 eine Höhe von 0,024 μg C3. Bei einem Angebot von 66,11 μg C3 lag die gebundene Menge bei 0,41 μg . Hier wurden also 6×10^5 bzw. $1,2 \times 10^7$ Moleküle C3 an den einzelnen Lymphozyten gebunden. Bei hohem Angebot wurden 0,7 % und bei niedrigem Angebot 0,8 % des C3-Angebotes von den Zellen angelagert.

Die entsprechenden Werte für die Inkubationstemperatur von 20°C und 37°C sind ebenfalls aus Abb. 2 zu ersehen. Bei einem Angebot von 1 μg bis 10 μg lagen die Werte für 20°C und 37°C

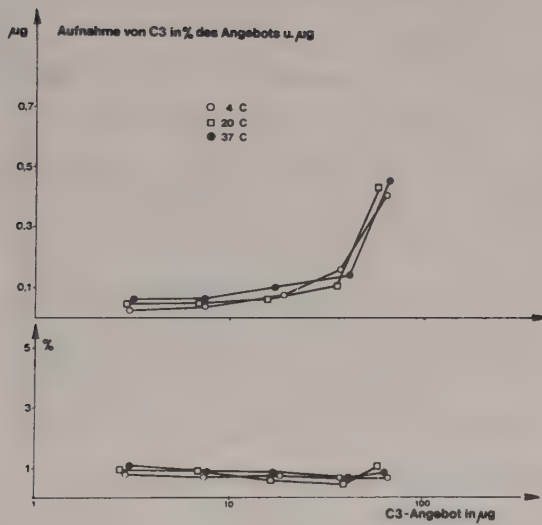


Abb. 2:

C3-Aufnahme der Raji-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur und dem C3-Angebot.
(Abszisse in logarithmischer Einteilung)

über denen für 4° C. Ansonsten fanden sich keine deutlichen Unterschiede.

1.1.3. Anlagerung von C3 mit stark erhöhter, spezifischer Aktivität (Abb. 3)

Da sich in den bisherigen Ansätzen kein typisches Sättigungsgleichgewicht einstellte und wir vermuteten, die Raji-Zellen mit der angebotenen C3-Menge möglicherweise schon übersättigt zu haben, wurde in einem weiteren Ansatz (bei 4° C) C3 mit einer höheren, spezifischen Aktivität (Markierung mit Bolton-Hunter Reagenz) eingesetzt. Die C3-Probe war mit 2×10^5 IPM/ug C3 markiert, was einer 10-fachen Aktivität entsprach, höher als bei früheren Makierungen. Die Bindungsstudie vom 22. 1. 1977 mit Raji-Zellen zeigte wiederum eine steigende Zunahme der C3-Anlagerung an die Zellen bei steigendem Angebot. 4,5 ug C3 als Angebot hatten eine C3-Aufnahme von 0,33 ug zur Folge ($= 9,9 \times 10^6$ Moleküle pro Zelle). 1,5 ug, 0,8 ug und 0,32 ug C3 als Angebot bewirkten eine C3-Aufnahme von 0,13 ug, 0,075 ug und 0,04 ug C3. Wurden den 1×10^5 Raji-Zellen nur 0,15 ug C3 angeboten, so sank die aufgenommene C3-Menge

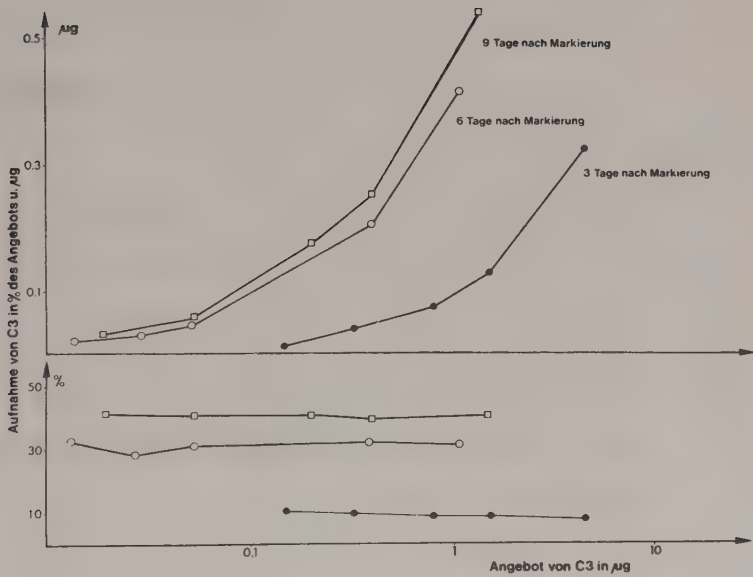


Abb. 3:

Anlagerung von C3 mit besonders hoher spezifischer Aktivität an Raji-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Markierung.

(Abszisse in logarithmischer Einteilung)

auf 0,015 ug C3 ab. Das bedeutet, daß $4,5 \times 10^5$ Moleküle pro Raji-Zelle gebunden wurden. Der prozentuale Anteil der Aufnahme vom Angebot lag bei einem Angebot von 4,5 ug C3 bei 7,5 % und stieg dann auf ca. 10 % bei einem C3-Angebot von 0,15 ug.

Eine Wiederholung dieser Anlagerungsversuche am 25. 1. 1977 ergab wiederum eine stetig steigende Aufnahme der Zellmembran für C3 bei steigendem Angebot. Nur hatte sich hier der prozentuale Anteil der Aufnahme vom Angebot von durchschnittlich 8,7 % auf durchschnittlich 32 % erhöht. Die Ansatzreihe vom 28. 1. 1977 zeigte sogar eine Steigerung der prozentualen C3-Aufnahme bis auf 40 % der angebotenen Menge. Bei Markierungen, die eine spezifische Aktivität von 1×10^5 IPM und weniger pro ug C3 zur Folge hatten, ließen sich diese Effekte nicht nachweisen.

1.1.4. Anlagerung von Meerschweinchen-C3 und C3b
an Raji-Zellen (Abb. 4)

Diese Versuche wurden durchgeführt, um zu sehen, ob sich Meerschweinchen C3 und C3b ähnlich wie C3^{hum} an die Lymphozyten anlagern. Es entsprachen $6,6 \times 10^4$ IPM 1 μg C3b.

Den 1×10^5 Raji-Zellen wurden zwischen 0,065 μg und 1,1 μg C3 und zwischen 0,18 μg und 2,37 μg C3b angeboten. Dabei zeigte sich, daß die Anlagerung von C3b im ganzen schlechter war als die Anlagerung von C3. Die Menge des an 1×10^5 Raji-Zellen gebundenen C3 variierte zwischen 5 ng bei niedrigem und 33 ng bei hohem C3-Angebot, die des gebundenen C3b zwischen 0,79 ng und 9,5 ng. Das bedeutet, daß bei einem Angebot von 1,1 μg C3 $9,93 \times 10^5$ Moleküle C3 pro Raji-Zelle und bei einem Angebot von 0,065 μg C3 $1,51 \times 10^5$ Moleküle C3 pro Zelle gebunden wurden. Die Ergebnisse für C3b lauteten: Einem Angebot von 0,18 μg C3 entsprach eine Aufnahme von $2,5 \times 10^4$ Molekülen C3b pro Raji-Zelle und ein Angebot von 2,37 μg C3b ergab eine Bindung von $3,1 \times 10^5$ Moleküle pro Zelle. Der prozentuale Anteil der Aufnahme vom

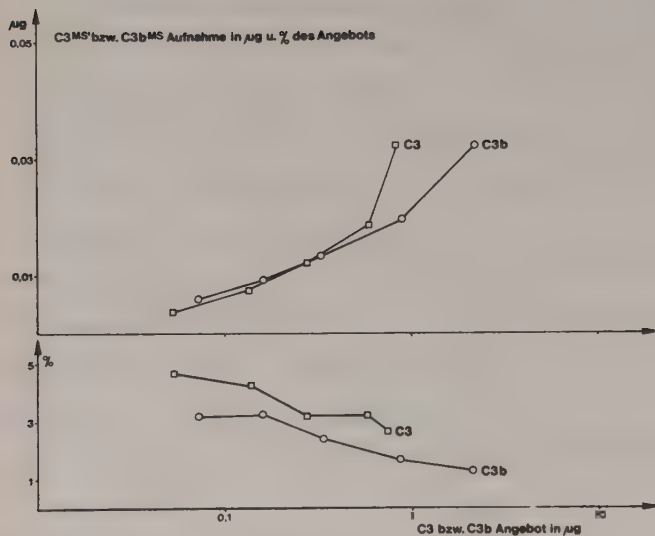


Abb. 4:

Anlagerung von Meerschweinchen-C3 und C3b an Raji-Zellen.
(Abszisse in logarithmischer Einteilung)

Angebot variierte bei der C3-Anlagerung zwischen 3 % bei hohem Angebot und 4 % bei niedrigem Angebot und bei der C3b-Anlagerung zwischen 0,4 % bei hohem Angebot und 0,6 % bei niedrigem Angebot.

1.1.5. Rosettenhemmtest durch natives C3 (Abb. 5)

Der Test zur Rosettenhemmung durch natives C3 sollte zeigen, wieviel C3 nötig ist, um die Rosettenbildung zwischen EAC 1423 und Raji-Zellen zu unterdrücken. Bei Zugabe von 200 ug nativem C3 waren im Rosettenhemmtest statt vorher 87 % nur noch 69 % der Lymphozyten fähig, Rosetten zu bilden. Bei Zugabe von 400 ug C3 bildeten nur noch 34 % der im Ansatz befindlichen Lymphozyten Rosetten, und 800 ug C3 im Ansatz ließ die Rosettenbildung auf 11 % absinken.

1.2. Bindungsstudie mit humanen Erythrozyten der Blutgruppe 0

Diese Versuchsreihe wurde mit humanen Erythrozyten durchgeführt, weil sie im Vergleich zu den Raji-Zellen einige unterschiedliche Merkmale haben. Man weiß erstens, daß diese Zellen nur C3b-Rezeptoren tragen, die eine geringe, laterale Mobilität besitzen. Zweitens sind histologische Unterschiede (Kernlosigkeit) und funktionelle Unterschiede offensichtlich.

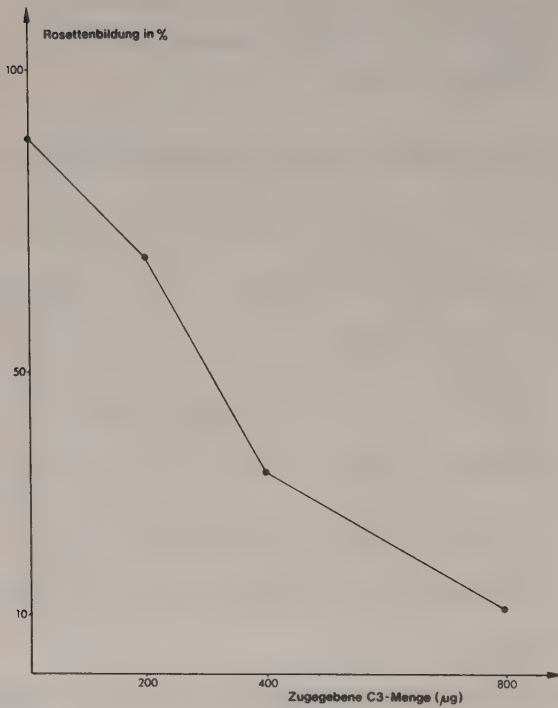


Abb. 5:

Hemmung der Rosettenbildung zwischen Raji-Zellen und EAC 1423b durch natives C3.

1.2.1. Variation der Inkubationszeit (Abb. 6)

Ein μg C3 entsprach bei diesem Versuch $2,7 \times 10^3$ IPM. Es ließ sich auch hier zeigen, daß sich bereits nach 5-minütiger Inkubationszeit ein endgültiges Bildungsgleichgewicht eingestellt hatte. Die eingesetzte C3-Menge betrug hier bei allen Ansätzen 152,7 μg C3. Nach einer Inkubationszeit von 5 Sekunden hatten sich 0,73 μg C3 an die 5×10^5 Erythrozyten angelagert ($4,39 \times 10^6$ Moleküle pro Erythrozyt), nach 20 Sekunden 1,09 μg C3 ($6,56 \times 10^6$ Moleküle pro Zelle). Nach einer 5-minütigen Inkubation waren dann 2,36 μg C3 an die Zellen angelagert, was $1,42 \times 10^7$ Molekülen C3 pro Erythrozyt entspricht. Dieser 5-Minuten-Wert blieb dann bei 15- und 30-minütiger Inkubation konstant. Der prozentuale Anteil der Aufnahme vom Angebot erhöhte sich von 0,4 % nach 5 Sekunden langer Inkubation bis auf einen Endwert von 1,5 % ab einer Inkubationszeit von 5 Minuten.

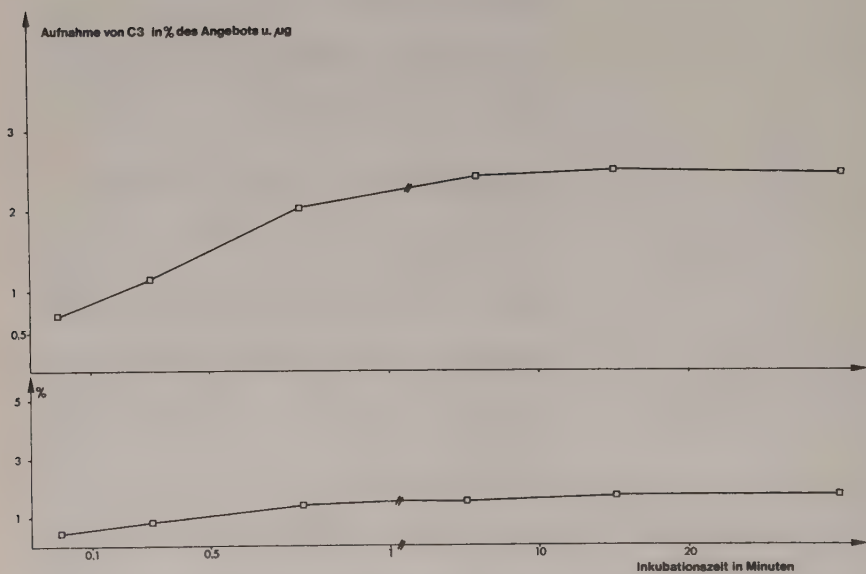


Abb. 6:

Einfluß der Inkubationszeit auf die C3-Anlagerung an Erythrozyten.

1.2.2. Anlagerungskinetik bei verschiedenen Inkubationstemperaturen (Abb. 7)

Die Inkubationstemperaturen wurden von 4°C über 20°C bis zu 37°C variiert. Wie sich aus Abbildung entnehmen läßt, ergaben sich durch die Temperaturveränderungen bei der Inkubation keine wesentlichen Veränderungen bezüglich der C3-C3-Rezeptorbindung.

1 μg C3 entsprach $2,74 \times 10^3$ IPM. Den 5×10^5 Erythrozyten wurden zwischen 31,1 μg und 615,8 μg C3 angeboten. Auch hier ergab sich wie bei den Raji-Zellen eine stetige Zunahme der C3-Aufnahme der Erythrozyten. Bei hohem C3-Angebot wurden 4,36 μg an die Erythrozyten angelagert, was einer Aufnahme von $2,7 \times 10^7$ Molekülen pro Zelle entspricht. Dem niedrigsten C3-Angebot entsprach eine Anlagerung von 0,36 μg . Das bedeutet, daß sich hier $2,16 \times 10^6$ Moleküle pro Zelle gebunden hatten. Ein Angebot von 396,7 μg bzw. 218,2 μg C3 hatte eine Aufnahme von 2,28 μg bzw. 1,21 μg zur Folge. Von 69,1 μg C3 als Angebot wurden schließlich 0,93 μg C3 an die im An-

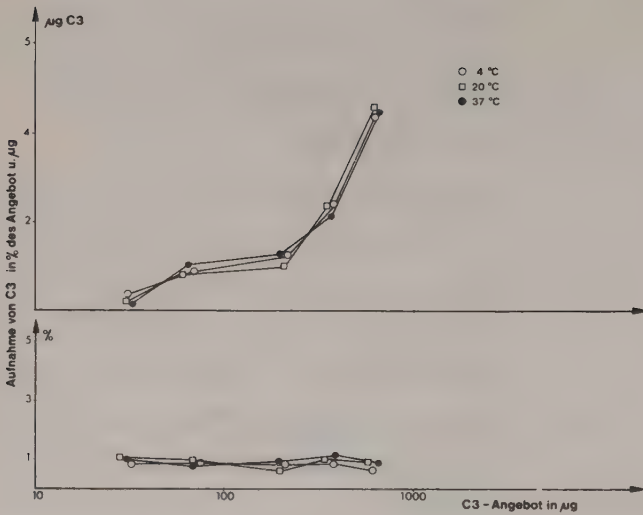


Abb. 7:

Abhängigkeit der C3-Aufnahme der Erythrozyten vom C3-Angebot bei unterschiedlicher Inkubationstemperatur.

(Abszisse in logarithmischer Einteilung)

satz befindlichen Erythrozyten gebunden.

Der prozentuale Anteil der C3-Aufnahme vom C3-Angebot lag bei allen Ansätzen knapp unter 1 %.

1.2.3. Anlagerung von C3b^{hum} und Meerschweinchen-C3 und C3b

a) Anlagerung von C3b^{hum} (Abb. 8 a)

Hier entsprachen $2,75 \times 10^3$ IPM 1 ug C3.

In diesem Versuch wurden den Zellen zwischen 0,15 ug und 1,03 ug C3b angeboten.

Es wurden an die 5×10^5 Erythrozyten zwischen 0,15 ug und 1,03 ug C3b gebunden.

Das entspricht einer Aufnahme zwischen $9,5 \times 10^5$ C3b Molekülen pro Zelle. Der prozentuale Anteil der Aufnahme vom Angebot bewegte sich konstant um 0,3 % und lag damit wesentlich niedriger als bei den entsprechenden Versuchen mit C3.

b) Anlagerung von Meerschweinchen-C3 und C3b (Abb. 8 b)

$6,6 \times 10^4$ IPM entsprachen 1 ug C3. Bei den Anlagerungsversuchen wurden den 5×10^5 Erythrozyten im Ansatz zwischen 0,053 und 0,81 ug C3 angeboten. Die angelagerten C3 Mengen lagen zwischen 4 ng und 32 ng C3, was einer Molekülzahl von $2,41 \times 10^4$

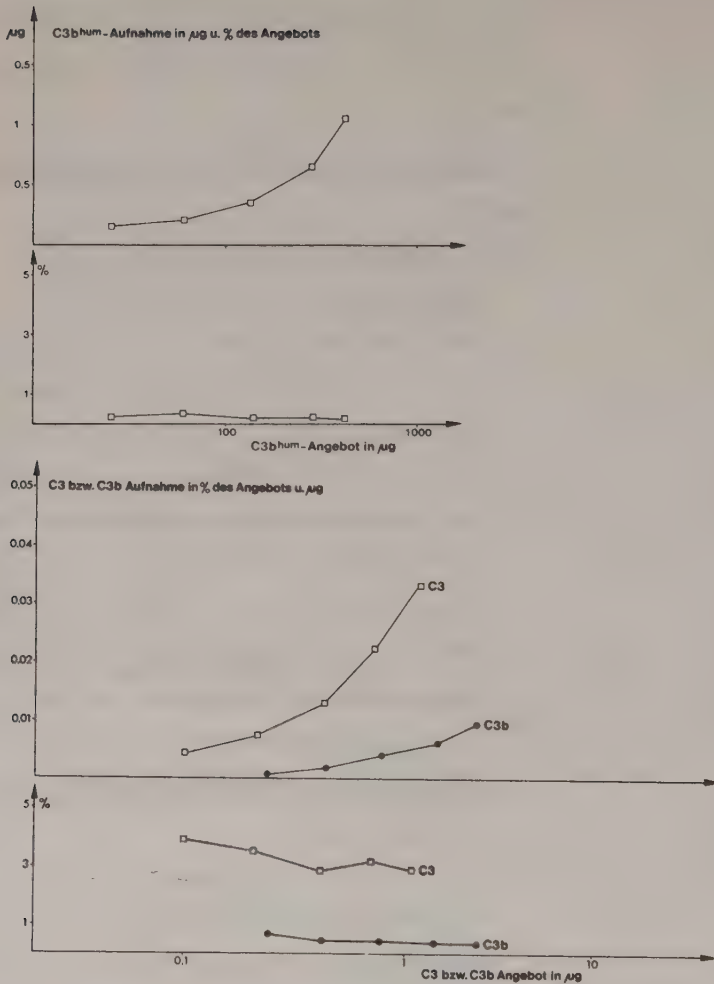


Abb. 8:

Anlagerung von humanem C3b (a) und Meerschweinchen-C3 und C3b (b) an Erythrozyten.

(Abszisse in logarithmischer Einteilung)

bzw. $1,98 \times 10^5$ pro Erythrozyt entspricht. Der prozentuale Anteil der C3-Aufnahme vom C3-Angebot bewegte sich zwischen 3,0 % bei hohem Angebot bzw. 4,5 % bei niedrigem Angebot.

1 μg C3b entsprach $6,4 \times 10^4$ IPM. Den Zellen wurden zwischen 0,073 μg und 2,14 μg C3b angeboten. Auch hier ergab sich eine stetige Zunahme der C3b-Aufnahme der Erythrozyten, nur spielte sie sich prozentual auf das Angebot bezogen auf einem niedrigeren Niveau als die Anlagerung von Meerschweinchen-C3 ab. Bei niedrigem C3b-Angebot wurden 6 ng C3b an 5×10^5 Erythrozyten gebunden, bei hohem Angebot belief sich die Bindung auf 32 ng. Das heißt, daß pro Erythrozyt zwischen $3,61 \times 10^4$ und $1,95 \times 10^5$ Moleküle gebunden werden. Der prozentuale Anteil der Aufnahme vom Angebot bewegte sich zwischen 1,0 % bei hohem Angebot und 3 % bei niedrigem Angebot.

1.3. Berechnung der Bindungskonstante

Zur Berechnung der Bindungskonstante wurden die Ergebnisse des Versuchs 1.1.2. gewählt. Die Scatchard-Ableitung erlaubt bei Darstellung von $\bar{V}/L$ gegen $\bar{V}$ die Angabe der Bindungskonstante aus der Steigung der Geraden.

Die Scatchard-Gleichung lautet (Ableitung s. Teil C):

$$\frac{\bar{V}}{\bar{L}} = -K_{ass} \times \bar{V} + K_{ass} \times n$$

Der Sättigungsgrad ist definiert als:

$$\bar{V} = \frac{R\bar{L}}{Z_0}$$

$\bar{L}$.: molare Konzentration an freien Liganden

n .: Zahl der Rezeptorbindestellen pro Zelle

$R\bar{L}$.: molare Konzentration an gebundenen Liganden

Z_0 .: molare Gesamtkonzentration an Zellen

L_0 .: molare Konzentration an angebotenen Liganden

Aus dem Scatchard-Plot (Abb. 9) läßt sich ersehen, daß die Steigung der Geraden gleich Null ist. Aufgrund dieses Tatbestandes lassen sich zwei Aussagen machen. Erstens können sich an die Zelloberfläche der Raji-Zellen unendlich viele C3-Moleküle binden, da die Kurve die X-Achse nicht im endlichen Bereich schneidet, und zweitens läßt sich die Assoziationskonstante für diese Bindungsverhältnisse nicht definieren.

Bestimmung der Daten für den Scatchard-Plot für den Versuch D 1.1.2.:

$$Z_0 = 10^5\text{-Zellen}/0,1\text{ ml} = 10^9\text{-Zellen/l}$$

$$Z_0 = \frac{10^9}{6,02 \times 10^{23}} = \frac{10 \times 10^8}{6,02 \times 10^{23}} = 1,66 \times 10^{-15} \text{ Mol/l}$$

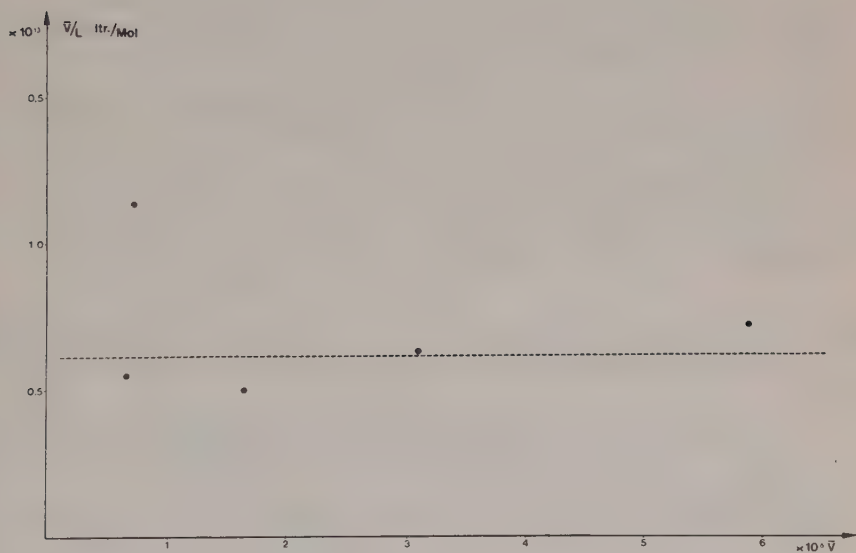


Abb. 9:

Darstellung des Scatchard-Plots für den Versuch D 1.1.2.
(Inkubationstemperatur 37°C).

L_0	RL	$L=L_0-RL$	$V=RL/Z_0$	V/L
8,42	9,85	8,26	5,93	0,72
4,94	5,1	4,89	3,07	0,63
3,31	2,7	3,39	1,63	0,5
1,28	1,13	1,27	0,67	0,53
0,66	1,2	0,64	0,73	1,13
$\times 10^{-7}$ Mol/l	$\times 10^{-9}$ Mol/l	$\times 10^{-7}$ Mol/l	$\times 10^6$	$\times 10^{13}$ Mol/l

Abklärung der Frage, ob sich C3 an schon gebundene C3-Moleküle anlagert

2.1. Anlagerung von markiertem C3 an mit C3 behandelte ,tannisierte Schafserythrozyten (Abb. 10):

Das verwendete C3 hatte eine spezifische Aktivität von $2,23 \times 10^4$ IPM pro μg C3.

2.1.1. Anlagerung von markiertem C3 an tannisierte Schafserythrozyten ohne C3-Behandlung

Bei diesem Versuch wurde das markierte C3 den Zellen in Mengen von 24,6 μg , 44,8 μg , 67,2 μg , 103,1 μg angeboten. Die C3-Aufnahme der 5×10^5 Schafserythrozyten variierte von 0,56 μg über 1,12 μg , 1,57 μg bis 2,7 μg C3. Das bedeutet, daß sich bei niedrigem Angebot 3,37 $\times 10^6$ Moleküle pro Zelle gebunden hatten und bei maxi-

malem Angebot $1,63 \times 10^7$ Moleküle pro Erythrozyt banden.

Der prozentuale Anteil der Aufnahme vom Angebot lag hier im Durchschnitt bei 2,5 %.

2.1.2. Anlagerung von markiertem C3 an tannisierte Schafserythrozyten, die mit 1,5 mg C3 auf 5×10^6 Erythrozyten vorinkubiert waren

Hier variierte das C3-Angebot wieder zwischen 24,2 ug und 105,7 ug C3. Die angelagerte C3-Menge stieg von 0,81 ug ($= 4,9 \times 10^6$ Moleküle pro Zelle) über 1,66 ug, 2,58 ug bis 3,6 ug C3 ($= 2,17 \times 10^7$ Moleküle pro Zelle) an.

Der prozentuale Anteil der C3-Aufnahme vom Angebot stieg hier durchschnittlich bis auf 3,2 %.

2.1.3. Anlagerung von markiertem C3 an tannisierte Schafserythrozyten, die mit 3,0 mg C3 auf 5×10^6 Erythrozyten vorinkubiert waren

Die angebotenen C3-Mengen variierten in dem in 2.1.1. und 2.1.2. angegebenen Bereich. Die gebundene C3-Menge lag zwischen 0,54 ug und 3,6 ug C3, d. h. sie nahm mit steigendem Angebot kontinuierlich zu. Die pro Schafserythrozyt gebundene Molekülmenge lag zwischen $3,25 \times 10^6$ und $2,17 \times 10^7$.

Der prozentuale Anteil der Aufnahme vom Angebot lag bei niedrigem Angebot bei 2,5 % und bei hohem Angebot bei 3,25 %.

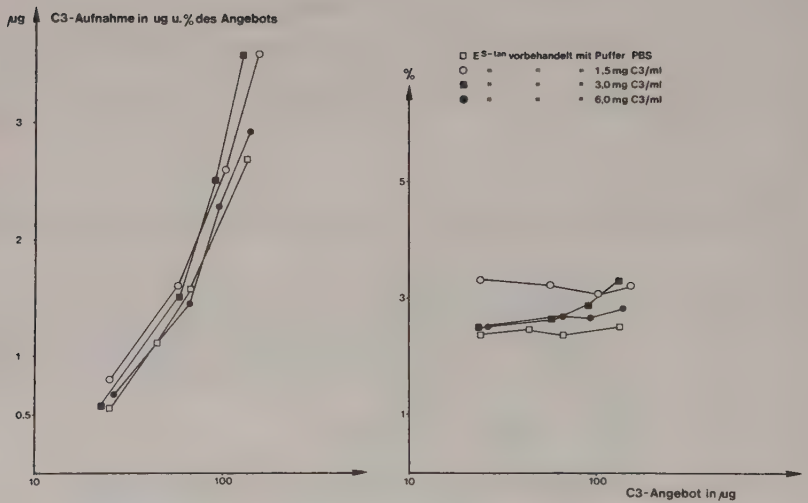


Abb. 10:

Anlagerung von markiertem C3 an mit unterschiedlichen C3-Mengen vorinkubierten Schafserythrozyten.

(Abszisse in logarithmischer Einteilung)

2.1.4. Anlagerung von markiertem C3 an tannisierte

Schafserythrozyten, die mit 6,0 mg C3 auf 5×10^6
Erythrozyten vorinkubiert waren

Die angebotene C3-Menge lag wie bei den vorangehenden Abschnitten zwischen 25,5 ug und 104,5 ug C3.

Die von den 5×10^5 Schafserythrozyten aufgenommene C3-Menge stieg von 0,67 ug C3 bei niedrigem Angebot bis auf 2,93 ug C3 bei hohem Angebot. Das bedeutet, daß zwischen $1,76 \times 10^7$ und $4,03 \times 10^6$ Moleküle pro Erythrozyt angelagert wurden.

Der prozentuale Anteil der Aufnahme vom Angebot lag zwischen 2,5 und 3,0 %.

2.2. Anlagerung von C3 an CN-BR-aktivierte Sepharose, die mit
unterschiedlichen C3-Mengen vorinkubiert war (Abb. 11)

Das C3 war mit $2,33 \times 10^4$ IPM pro ug markiert. Die angebotene C3-Menge fiel in allen vier Ansätzen von 13,4 ug über 6,5 ug, 3,2 ug bis auf 1,43 ug C3 ab.

2.2.1. Anlagerung von markiertem C3 an CN-BR-aktivierte
Sepharose, die nicht mit C3 vorinkubiert worden
war

Bei niedrigem Angebot wurden hier 0,043 ug C3 gebunden. Diese Menge stieg über 0,074 ug, 0,18 ug bis auf 0,29 ug C3 an.

Hier lag der prozentuale Anteil der Aufnahme vom Angebot im Durchschnitt bei 2,5 %.

2.2.2. Anlagerung von markiertem C3 an CN-BR-Seph-
arose, die mit 1,5 ug C3 auf 1000 ml
Seph-
arose vorinkubiert war

Hier wurden bei niedrigem Angebot 0,049 ug C3 gebunden. Dieser Wert erhöhte sich bei höherem Angebot über 0,076 ug, 0,16 ug bis auf 0,25 ug C3.

Der prozentuale Anteil der Aufnahme vom Angebot lag bei hohem Angebot bei 2,15 % und stieg bei geringerem Angebot bis auf 3,6 % an.

2.2.3. Anlagerung von markiertem C3 an CN-BR-Seph-
arose, die mit 3,0 mg C3 auf 1000 ml Sepha-
rose vorinkubiert war

Hier variierte die aufgenommene C3-Menge zwischen 0,036 ug C3 und 0,25 ug C3. Zwischen diesen beiden Werten war ein kontinuierlicher Anstieg der angelagerten C3-Menge bei steigendem Angebot festzustellen.

Der Anteil der aufgenommenen C3-Menge vom C3-Angebot lag hier zwischen 2,0 und 2,5 %.

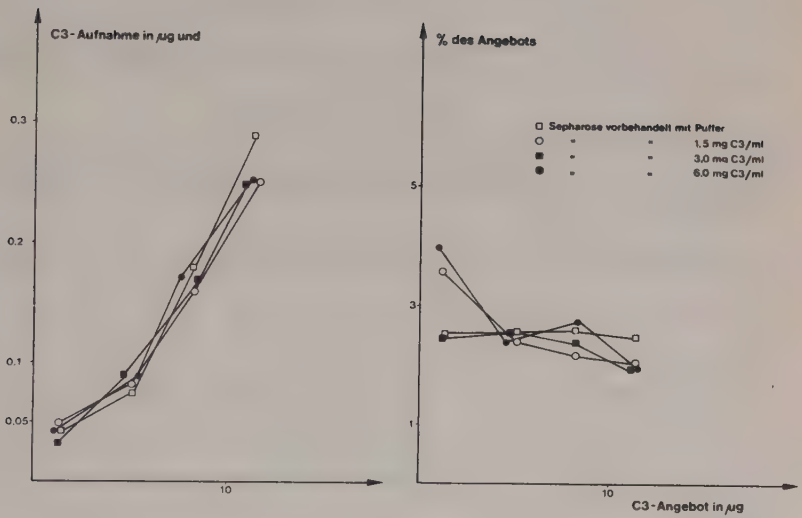


Abb. 11:

Anlagerung von markiertem C3 an mit unterschiedlichen C3-Mengen vorinkubierter, aktivierter Sepharose.
(Abszisse in logarithmischer Einteilung)

2.2.4. Anlagerung von C3 an mit 6,0 mg C3 auf
1000 ml Sepharose vorinkubierter CN-BR-
Sepharose

Im Bereich der angebotenen C3-Menge schwankte der angelagerte Anteil, ähnlich, wie bei den ersten drei Versuchen, nämlich zwischen 0,045 und 0,25 μ g C3. Zwischen diesen beiden Werten ergab sich eine kontinuierliche Zunahme der angelagerten C3-Menge.

3. Beeinflussung des Bindungsverhaltens von C3 an Raji-Zellen
durch Denaturierung

Das Bindungsverhalten von denaturiertem C3 wurde mit Hilfe von Bindungsstudien an Raji-Zellen und mit der C3-induzierten Hemmung der Rosettenbildung zwischen komplementbeladenen Erythrozyten und Raji-Zellen untersucht. Zur Denaturierung des C3-Moleküls wurden Kaliumbromid, Mercaptoäthanol und Jodacetamid, Harnstoff, γ -Strahlen und unterschiedliche Wasserstoffionenkonzentrationen eingesetzt (s. C. 2.1.2.). In diesem Abschnitt wurde der Rosettenhemmtest in einem Inkubationsvolumen von 600 μ l und die Bindungsstudien bei einem Inkubationsvolumen von 200 μ l durchgeführt. Das Ergebnis des zur Orientierung gemachten Rosettenhemmtests mit nativem C3 ist in Abbildung 5 dargestellt. Diese Hemmkurve wird in den folgenden Abbildungen jeweils zum Vergleich wiedergegeben.

3.1.1. Behandlung mit Kaliumbromid (2,5 M)

a) Bindungsstudie (Abb. 12)

Das C3 hatte hier eine spezifische Aktivität von 506 IPM pro ug C3. Die Bindungsstudie ergab, daß mit zunehmendem C3-Angebot die Aufnahmefähigkeit der Zellen zunahm. Bei einer Zugabe von 470,6 ug zu den 1×10^5 Raji-Zellen lag die Aufnahme bei 43,0 ug C3, was $1,39 \times 10^9$ Moleküle pro Zelle entspricht. Bei geringerem C3-Angebot fiel die angelagerte C3-Menge stetig ab und erreichte bei einer Zugabe von 107 ug C3 einen Wert von 11,8 ug, was $3,56 \times 10^8$ Molekülen pro Zelle entspricht.

Der prozentuale Anteil der C3-Aufnahme vom C3-Angebot lag aber bei dem kaliumbromidbehandelten C3 deutlich über dem des nativen C3. Von der angebotenen Proteinmenge wurden durchschnittlich 10 % gebunden.

b) Rosettenhemmtest (Abb. 13)

Hierbei ergab sich, daß mit Kaliumbromidvorinkubiertes C3 nicht die Fähigkeit hatte, die Rosettenbildung zu hemmen. Bei Zugabe von 800 ug, 400 ug und 200 ug

blieb die Rosettenbildungsfähigkeit wie bei dem Test ohne C3-Zugabe bei durchschnittlich 75 % der Lymphozyten erhalten.

Ob sich hier die mit Komplement beladenen Erythrozyten direkt an den C3-Rezeptor oder an das denaturierte C3 auf den Raji-Zellen anlagerten, konnte nicht geklärt werden.

3.1.2. Behandlung des C3 mit Mercaptoäthanol
(1 M) und Jodacetamid (1 M)

a) Bindungsstudie (Abb. 12)

Ein μg C3 entsprach bei diesem Versuch 662 IPM. Das C3 zeigte nach der Vorinkubation mit Mercaptoäthanol und Jodacetamid eine besonders starke Affinität zur Zelloberfläche. Von der angebotenen C3-Menge banden sich durchschnittlich 65 %. Einem Angebot von 453,2 μg C3 lag eine Aufnahme von 266,1 μg gegenüber, was $8,08 \times 10^9$ Molekülen pro Zelle entspricht. Von 249,2 μg C3 wurden 185,8 μg und von 158,6 μg C3 wurden 128,4 μg von den 1×10^5 Lymphozyten aufgenommen. Das niedrigste Angebot von 75,5 μg C3 hatte eine Aufnahme von 57,4 μg C3 zur Folge, was $1,73 \times 10^9$ Mole-

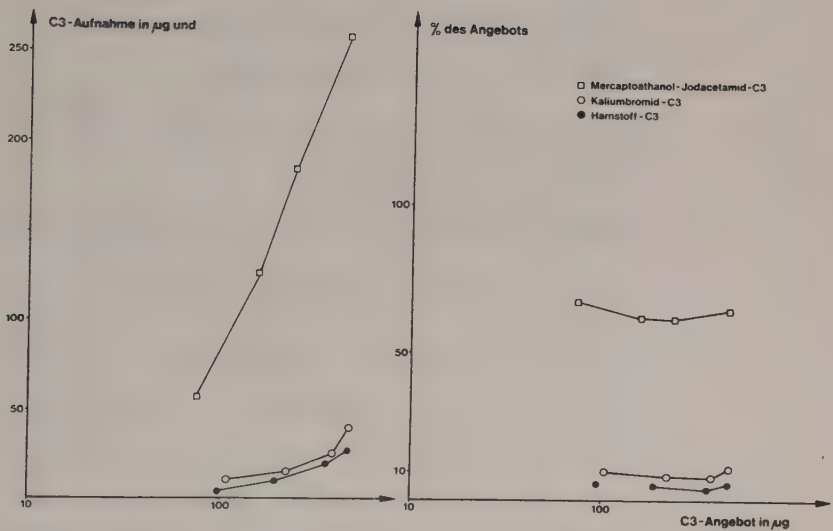


Abb. 12:

Anlagerung von mit Kaliumbromid, mit Mercaptoäthanol und Jodacetamid und mit Harnstoff-denaturiertem C3.

külen pro Zelle entsprach.

b) Rosettenhemmtest (Abb. 13)

Auch hier war das denaturierte C3 nicht in der Lage, die Rosettenformation zu hemmen. Die Rosettenbildungsfähigkeit lag bei den Lymphozyten bei Zugabe zwischen 0 ug und 800 ug C3 bei durchschnittlich 75 %.

3.1.3. Denaturierung des C3 mit Harnstoff

a) Bindungsstudie (Abb. 12)

Bei dem Anlagerungsversuch mit harnstoffbehandeltem C3 an die Raji-Zellen war dieses C3 mit 1230 IPM pro ug C3 markiert. Die den Zellen angebotene C3-Menge variierte zwischen 97,6 ug und 455,3 ug. Die angelagerte C3-Menge belief sich auf 5,1 ug C3 bei niedrigem Angebot und 26,8 ug bei hohem Angebot. Das bedeutet, daß zwischen $1,54 \times 10^8$ und $8,07 \times 10^8$ Molekülen pro Zelle gebunden wurde. Der prozentuale Anteil der Aufnahme vom Angebot bewegt sich um 5,6 %.

b) Rosettenhemmtest (Abb. 13)

Beim Rosettenhemmtest war die Hemmung der Rosettenbildung deutlich verschlechtert. Bei Zugabe von 800 und 400 ug denaturiertem C3 lag die Rosettenbildung bei 55 %.

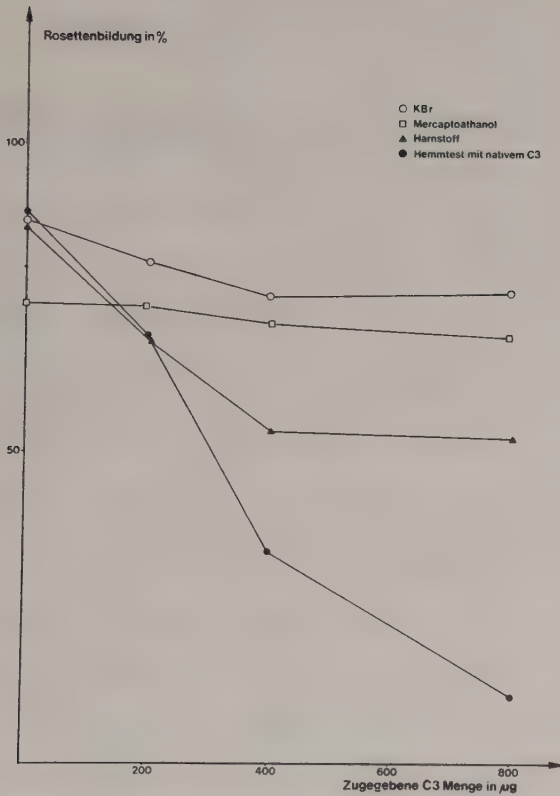


Abb. 13:

Hemmung der Rosettenbildung zwischen Raji-Zellen und EAC 1423b durch mit Kaliumbromid, mit Mercaptoäthanol und Jodacetamid und mit Harnstoff-denaturiertem C3.

3.1.4. Denaturierung des C3 durch γ -Strahlen

Auf die denaturierende Wirkung von γ -Strahlen wurden wir durch die Ergebnisse des Versuchs 1.1.3. aufmerksam. Aus diesem Grunde versuchten wir die Wirkung der Bestrahlung von C3 bezüglich seines Bindungsverhaltens an den C3-Rezeptor auszutesten.

a) Denaturierung des C3 durch Bestrahlung mit 10 rad (Abb. 14 und 15)

Das C3 hatte eine spezifische Aktivität von 2061,5 IPM pro μ g C3.

Das C3 wurde von den Zellen bei einem Angebot zwischen 463 μ g und 35,6 μ g in einer Größenordnung zwischen 3,85 und 0,26 μ g gebunden. Der prozentuale Anteil der C3-Aufnahme vom Angebot lag hier bei durchschnittlich 0,75 %. Wie nicht bestrahltes C3 hatte das mit 10 rad bestrahlte C3 seine Fähigkeit, die Rosettenbildung zu hemmen, behalten. Die Raji-Zellen bildeten bei Zugabe von 800 μ g bestrahltem C3 nur zu 16 % Rosetten.

b) Bestrahlung des C3 mit 200 rad (Abb. 14 und 15)

Das C3 hatte eine spezifische Aktivität von 1994 IPM pro μ g C3. Das mit 200 rad bestrahlte C3 wurde den Raji-Zellen wieder in Größenordnungen zwischen 31,4 und 448,9 μ g ange-

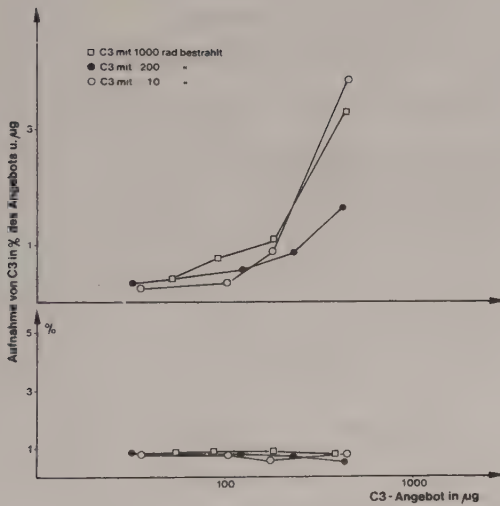


Abb. 14:

Bindungsstudien von mit β -Strahlen (10 rad, 200 rad, 1000 rad) bestrahltem C3 an Raji-Zellen.

(Abszisse in logarithmischer Einteilung)

boten. Die Aufnahme stieg dabei von 0,31 ug C3 ($= 9,3 \times 10^6$ Moleküle pro Zelle) bis auf 1,65 ug C3 ($= 4,97 \times 10^7$ Moleküle pro Zelle) an. Der prozentuale Anteil der Aufnahme vom Angebot lag bei hohem C3-Angebot um 0,5 % und stieg auf 0,9 % bei niedrigem Angebot.

C3, das mit 200 rad bestrahlt wurde, war nicht mehr so gut in der Lage, die Rosettenbildung zu verhindern. Bei Zugabe von 800 ug denaturiertem C3 bildeten noch 55 % der Lymphozyten Rosetten, bei Zugabe von 400 ug C3 lag die Rosettenbildung bei 70 %. 200 ug C3 ließen sogar noch 80 % Rosetten zu. Dieser Wert war gleich dem Prozentsatz an Rosetten, den man erhielt, wenn man überhaupt kein C3 zum Ansatz hinzugab.

c) Bestrahlung des C3 mit 1000 rad (Abb. 14 und 15)

Das mit 1000 rad bestrahlte C3 war mit 1279 IPM pro ug C3 markiert und wurde in Mengen zwischen 53,2 ug und 450,2 ug den 1×10^5 Raji-Zellen angeboten. Die Aufnahme variierte zwischen 0,4 ug und 3,34 ug C3. Das bedeutet, daß sich hier zwischen $1,2 \times 10^7$ und $1,01 \times 10^8$ Moleküle an jede Zelle anlagerten. Zwischen diesen beiden Werten nahm die gebundene Menge

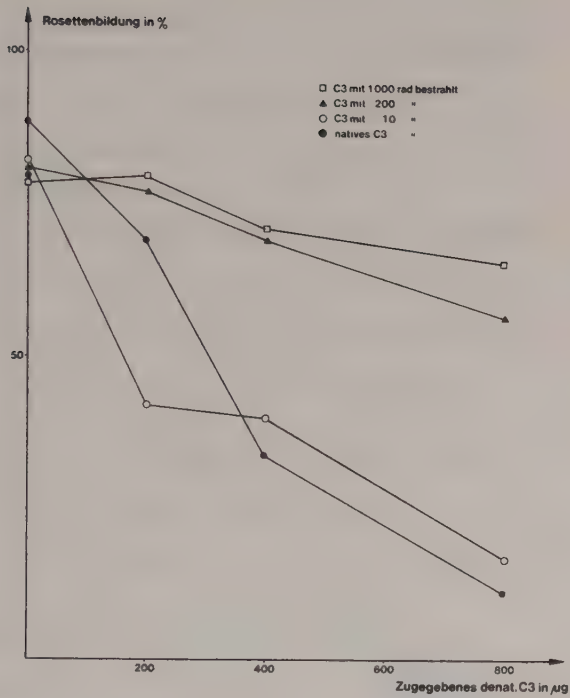


Abb. 15:

Hemmung der Rosettenbildung zwischen Raji-Zellen und EAC 1423b durch mit β -Strahlen (10 rad, 200 rad, 1000 rad)-bestrahltem C3.

C3 mit steigendem Angebot kontinuierlich zu. Der prozentuale Anteil der C3-Aufnahme vom Angebot lag hier durchschnittlich bei 0,8 %. Bei mit 1000 rad bestrahltem C3 konnte man eine Rosettenhemmung kaum noch feststellen. Von den mit 800 ug bzw. 400 ug vorinkubierten Raji-Zellen konnten noch 65 % bzw. 70 % Rosetten bilden. Bei der Zugabe von 200 ug C3 bzw. ohne Zugabe von C3 lag die Rosettenbildungsfähigkeit der Raji-Zellen bei 80 %.

3.1.5. Behandlung des C3 durch Erhitzen

a) Behandlung des C3 mit 100° C (Abb. 16 und 17)

Die spezifische Aktivität lag hier bei 1096 IPM pro ug C3. Den 1×10^5 Raji-Zellen wurden 450 ug, 226,4 ug, 122,6 ug und 58,4 ug C3 angeboten. Dabei fiel die angelagerte C3-Menge von 2,01 ug C3 ($= 6,05 \times 10^7$ Moleküle pro Zelle) über 1,51 ug C3, 0,89 ug C3 bis auf 0,5 ug ($= 1,51 \times 10^7$ Moleküle pro Zelle) ab. Der prozentuale Anteil der Aufnahme vom Angebot variierte von 0,5 % bei hohem Angebot bis 0,9 % bei niedrigem Angebot.

Der Rosettenhemmtest des bei 100° C vorinkubierten C3 ergab ein leicht geringeres Hemmvermögen der Rosettenformationen.

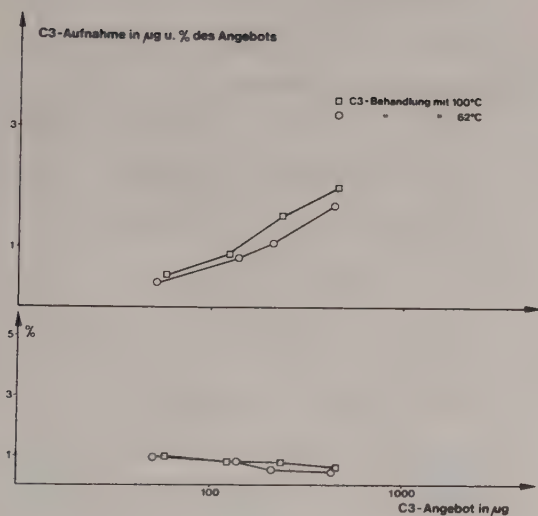


Abb. 16:

Bindungsstudie von mit Hitze (62°C , 100°C) behandeltem C3 an Raji-Zellen.

(Abszisse in logarithmischer Einteilung)

b) Behandlung des C3 mit 62° C (Abb. 16 und 17)

Das mit 62° C vorbehandelte C3 hatte eine spezifische Aktivität von 1050,9 IPM pro ug C3. Das Angebot von C3 variierte bei der Bindungsstudie zwischen 428,6 ug und 52,4 ug. Die 1×10^5 Raji-Zellen nahmen 1,7 ug bzw. 0,43 ug C3 auf. Zwischen diesen beiden Werten fiel die angelagerte C3-Menge kontinuierlich ab. Die pro Zelle gebundene Molekülmenge lag zwischen $5,1 \times 10^7$ und $1,3 \times 10^7$. Der prozentuale Anteil der Aufnahme vom Angebot variierte hier zwischen 0,4 % bei hohem und 0,9 % bei niedrigem Angebot.

Der Rosettenhemmtest zeigte, daß mit 62° C vorbehandeltes C3 die Rosettenbildung geringfügig stärker hemmte als natives C3. 800 ug natives C3 erlaubten eine Rosettenbildung von 11 %; mit 62° C vorbehandeltes C3 ließ bei derselben Menge nur eine Rosettenbildung von 4 % zu. Bei Zugabe geringerer C3-Mengen lag die Fähigkeit, Rosetten zu hemmen, bei hitzebehandeltem und nativem C3 auf gleichem Niveau.

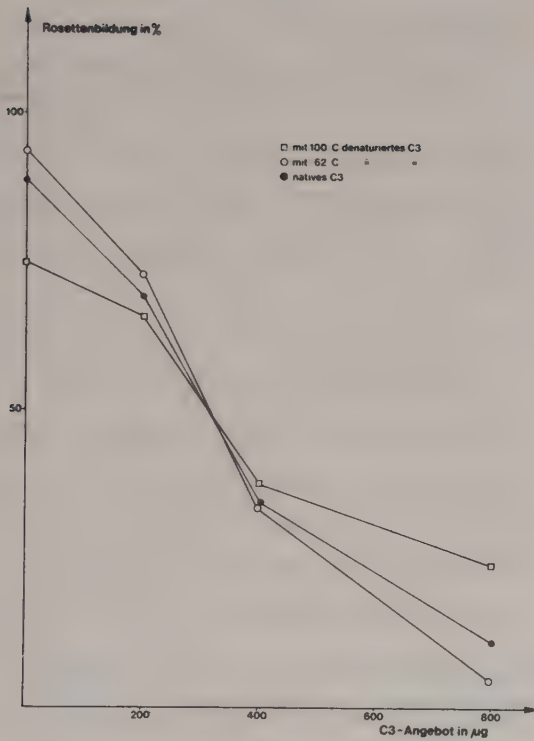


Abb. 17:

Hemmung der Rosettenbildung zwischen Raji-Zellen und EAC 1423b durch mit Hitze (62°C , 100°C) behandeltes C3.

3.1.6. Versuche mit pH 2- und pH 12-denaturiertem C3 (Abb. 18)

Bei der Vorinkubation von C3 in einem pH-Milieu von 12 ließ sich eine schwächere Hemmung der Rosettenformation nachweisen als mit nativem C3 sowie mit pH 2 behandeltem C3. Es entstanden durchschnittlich 45 % Rosetten bei dem in alkalischem Milieu vorinkubierten C3. Natives C3 ließ nur 11 % Rosetten entstehen (Alle Werte gelten für die Zugabe von 800 µg C3 zum Rosettenhemmtest). Bei der Zugabe geringerer Mengen C3 zum Ansatz verringerten sich diese Unterschiede.

Bei jedem Versuch wurde ein Rosettenhemmtest in einem PBS-Medium gemacht, das die Restkonzentration des zur Denaturierung eingesetzten Reagens nach entsprechender Dialyse enthielt. Es zeigte sich, daß dieser Rest in keinem Fall Einfluß auf die Interaktion zwischen EAC 1423 und Raji-Zellen hatte.

4. Bindungsstudien unter veränderten Milieubedingungen

Um zu untersuchen, ob veränderte Milieubedingungen einen Einfluß auf die Reaktion zwischen C3-Molekül und Rezeptor haben, wurden folgende Parameter verändert: pH-Wert und Ionenstärke im Medium.

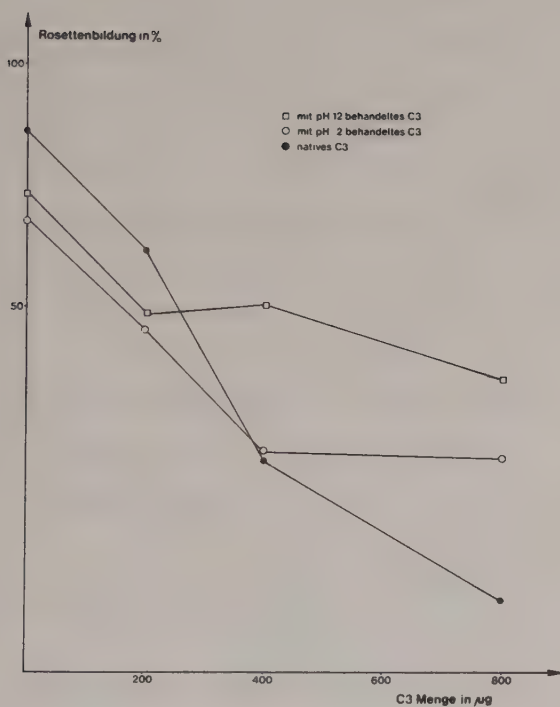


Abb. 18:

Hemmung der Rosettenbildung zwischen Raji-Zellen und EAC 1423 durch mit sauren (pH 2) und basischen (pH 12) Lösungen-behandeltes C3.

4.1. Bindungsstudien mit Raji-Zellen

$6,4 \times 10^4$ IPM entsprachen hier einem μg C3.

4.1.1. Veränderung des pH-Wertes (Abb. 19)

Bei diesem Ansatz war das C3-Angebot bei den verschiedenen pH-Werten konstant und betrug $7,5 \mu\text{g}$ C3. Es wurden also jedem Lymphozyten $2,26 \times 10^8$ Moleküle C3 angeboten. Bei pH-Werten von 6,5, 7,0 und 7,5 lag die C3-Aufnahme bei $0,094 \mu\text{g}$ C3. Der pH-Wert von 8,0 bewirkte eine Zunahme der an die 1×10^5 Raji-Zellen angelagerten C3-Menge bis auf $0,12 \mu\text{g}$ C3. Ein pH-Wert von 8,5 ließ die pro Zelle angelagerte Molekülnzahl auf $4,52 \times 10^6$ zunehmen.

Der prozentuale Anteil der C3-Aufnahme vom Angebot betrug bei niedrigem pH-Wert (pH = 6,5) 1,6 % und bei alkalischem pH-Wert (pH = 8,5) 2,0 %.

4.1.2. Variation der NaCl-Konzentration im Reaktionsmedium (Abb. 20)

Die Einwirkung höherer Salzkonzentrationen auf das Reaktionsmilieu verschlechtert merklich die Bedingungen für die Bindung von C3 an die Zelloberfläche. Den Zellen wurden immer $9,84 \mu\text{g}$ C3 angeboten. Ein $0,077$ und

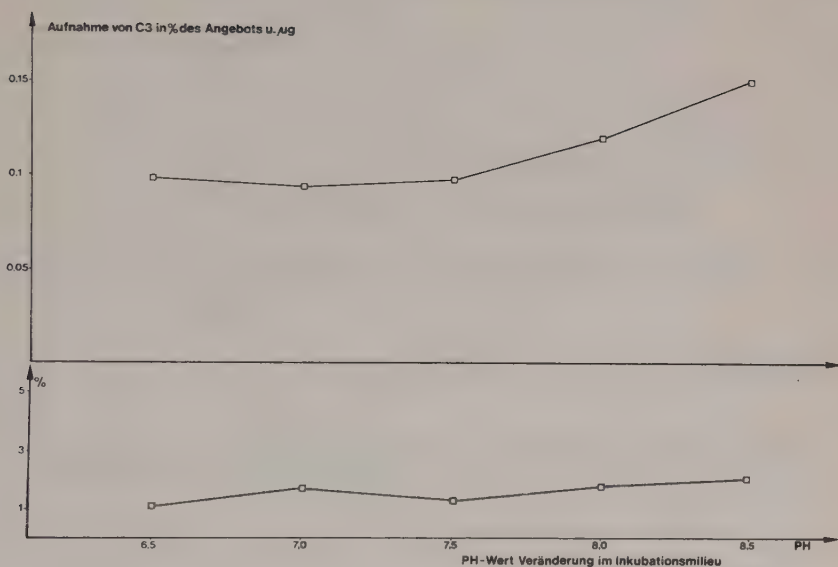


Abb. 19:

Darstellung der Abhängigkeit der C3-Anlagerung an Raji-Zellen vom pH-Wert des Inkubationsmediums.

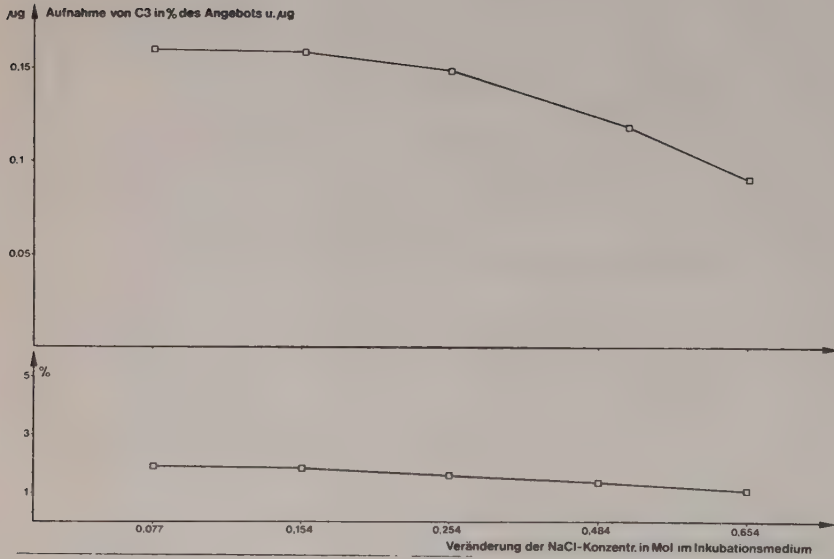


Abb. 20:

Darstellung der Abhängigkeit der C3-Anlagerung an Raji-Zellen von der NaCl-Konzentration des Inkubationsmilieus.

0,154 molares NaCl-Milieu ermöglichte eine C3-Aufnahme von 0,16 ug C3 ($9,63 \times 10^6$ Moleküle pro Zelle). Bei einer molaren NaCl-Konzentration von 0,254 und 0,484 lag die C3-Aufnahme bei 0,15 bzw. 0,12 ug C3. Eine 0,654 molare NaCl-Lösung verminderte die Aufnahme der Zellen sogar auf 0,086 ug, was $2,59 \times 10^6$ Molekülen pro Raji-Zelle entspricht.

Die prozentuale Aufnahme vom C3 durch die Zellen verminderte sich ebenfalls von 1,9 % bei einer NaCl-Konzentration von 0,077 M bis auf 1,0 % bei einer 0,654 molaren NaCl-Konzentration.

4.2. Bindungsstudien mit humanen Erythrozyten der Blutgruppe O

4.2.1. Veränderung des pH-Wertes im Reaktionsmedium (Abb. 21)

Hier entsprachen $2,75 \times 10^3$ IPM bzw. beim Kontrollsatz $7,75 \times 10^3$ IMP einem ug C3. Den 5×10^5 Erythrozyten wurden immer 99,2 ug C3 angeboten. Im sauren pH-Bereich (pH = 6,5 und 7,0) wurden 0,90 ug C3 an die 5×10^5 Erythrozyten gebunden, was $5,42 \times 10^6$ Molekülen pro Erythrozyt entspricht. Ein pH-Wert von 7,5 bzw. 8,0 ermöglichte den 5×10^5 Erythrozyten eine Aufnahme von 1,56 ug C3 ($= 9,39 \times 10^6$ Moleküle pro Erythrozyt).

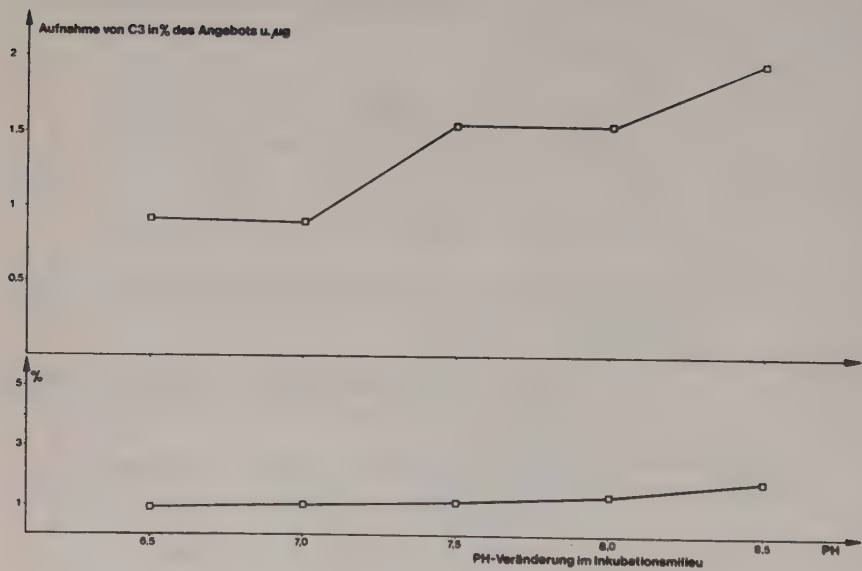


Abb. 21:

Darstellung der Abhängigkeit der C3-Anlagerung an humane Erythrozyten vom pH-Wert des Inkubationsmediums.

Der pH-Wert von 8,5 ließ dagegen eine Anlagerung von $1,18 \times 10^7$ Molekülen pro Erythrozyt zu, was einer Gesamtaufnahme von 1,96 ug entspricht. Ebenso variierte die prozentuale Aufnahme zwischen 0,9 % bei einem pH-Wert von 6,5 und 1,8 % bei einem pH-Wert von 8,5.

4.2.2. Veränderung der Salzkonzentration im Reaktionsmedium (Abb. 22)

Hier entsprachen $2,75 \times 10^3$ IPM einem ug C3. Den 5×10^5 Erythrozyten wurden konstant 141,8 ug C3 angeboten. Dabei ergab sich, daß mit steigender Ionenstärke im Reaktionsmedium die aufgenommene C3-Menge abnahm. Eine Veränderung der Salzkonzentration zwischen 0,77 M NaCl über 0,154 M NaCl bis auf 0,254 M NaCl ließ keine Veränderung der Aufnahmefähigkeit der Erythrozyten für C3 erkennen. Die C3-Aufnahme der 5×10^5 Erythrozyten lag in allen drei Ansätzen bei 1,64 ug C3, was $9,9 \times 10^6$ C3-Molekülen pro Erythrozyt entspricht. Eine 0,484 M NaCl-Lösung ergab eine Aufnahme von 1,27 ug C3 ($7,65 \times 10^6$ Moleküle pro Zelle). 0,654 M NaCl-Lösungen ließen die C3-Aufnahme auf 0,36 ug absinken.

Der prozentuale Anteil der C3-Aufnahme vom C3-Angebot erhöhte sich von 0,3 % bei hoher Salzkonzentration im Medium bis auf 1,3 % bei den 3 niedrigsten Ionenstärken im Inkubationsmilieu.

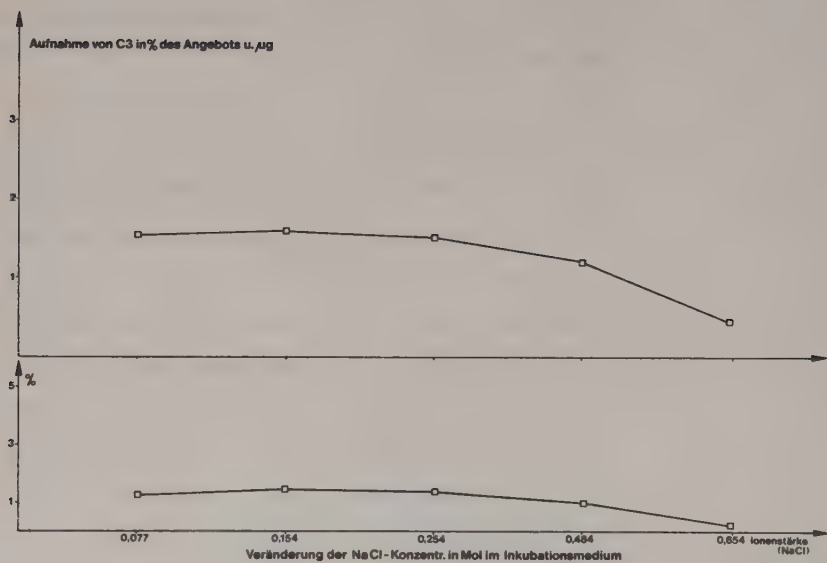


Abb. 22:

Darstellung der Abhängigkeit der C3-Anlagerung an humane Erythrozyten von der NaCl-Konzentration des Inkubationsmilieus.

5. Bindungsstudien nach Veränderung der Membraneigenschaften von Raji-Zellen

Um die C3-Anlagerung nach Membranveränderungen der rezeptortragenden Zellen zu beobachten, wurden die Raji-Zellen mit Novocain, DFP und Glutaraldehyd behandelt.

5.1. Behandlung der Raji-Zellen mit Novocain (Abb. 23)

$2,73 \times 10^3$ IPM entsprachen hier einem μg C3. Den 1×10^5 Raji-Zellen wurden immer 172,2 μg C3 angeboten. Die Versuchsreihe zeigte, daß relativ hohe Novocainkonzentrationen die Anlagerung von C3 an die Raji-Zellen hemmen können. Eine 3×10^{-2} M Novocainlösung ermöglichte eine C3-Anlagerung von 0,55 μg C3 an die Zelloberfläche der Raji-Zellen. Das entspricht $3,3 \times 10^7$ Molekülen pro Zelle. Die von den Zellen aufgenommene C3-Menge entsprach bei einer 3×10^{-3} M Novocainlösung 0,73 μg C3 und bei einer 3×10^{-4} M Novocainlösung 1,09 μg C3. Eine 3×10^{-5} M Novocainlösung ließ die Bindung von 1,45 μg C3 ($= 8,73 \times 10^7$ Moleküle pro Zelle) zu. Ein Vergleichswert ohne Novocain ergab eine Anlagerung von 2,18 μg C3 ($= 6,56 \times 10^7$ Moleküle pro Zelle). Der prozentuale Anteil der C3-Aufnahme vom Angebot nahm ebenfalls von 0,25 % bei einer 3×10^{-2} M Novocainlösung über 0,6 %, bei einer 3×10^{-4} M Novocainlösung bis auf 1,4 % bei Inkubation der Zellen ohne Novocain zu.

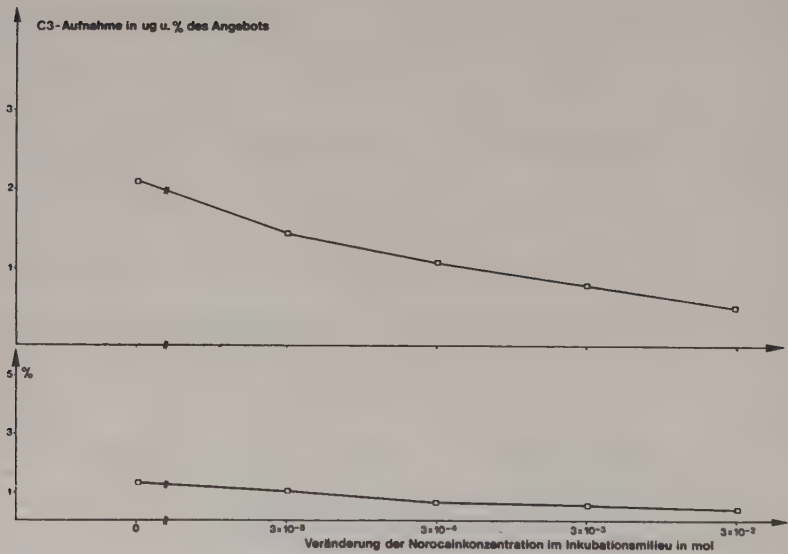


Abb. 23:

Abhängigkeit der C3-Anlagerung an Raji-Zellen von der Vorbehandlung der Raji-Membran mit unterschiedlichen Novocainkonzentrationen.

5.2. Anlagerung von C3 an Raji-Zellen, die mit DFP vorbehandelt waren

Aufgrund der Vorstellung, daß Proteasen auf der Zelloberfläche der Raji-Zellen für die unspezifische Anlagerung des C3 an die Lymphozyten verantwortlich sein könnten, versuchte ich durch Vorinkubation der Raji-Zellen mit DFP die Proteasen zu hemmen.

5.2.1. Vorbehandlung der Raji-Zellen mit einem mM DFP (Abb. 24)

Ein μg C3 entsprach in diesem Versuch $2,1 \times 10^4$ IPM. Nach Vorbehandlung der Raji-Zellen mit einer 1 mM DFP-Lösung verschlechterte sich die Anlagerung von C3. Bei einem Angebot von 76,2 μg C3 lag die Aufnahme der 1×10^5 Lymphozyten nach Behandlung mit DFP bei 0,29 μg C3 (8,73 $\times 10^6$ Moleküle pro Zelle). Ohne Behandlung mit DFP wurden bei diesem C3-Angebot 0,34 μg C3 angelagert. Der Unterschied in der Aufnahmefähigkeit von C3 zwischen vorbehandelten und nicht behandelten Raji-Zellen blieb auch bei einem Angebot von 38,1 bzw. 19,1 μg erhalten, wurde aber stets kleiner. Bei einem Angebot von 9,5 μg C3 lag die C3-Aufnahme der unbehandelten Raji-Zellen bei 59,5 ng C3 (1,79 $\times 10^6$ Moleküle C3 pro Zelle) und die

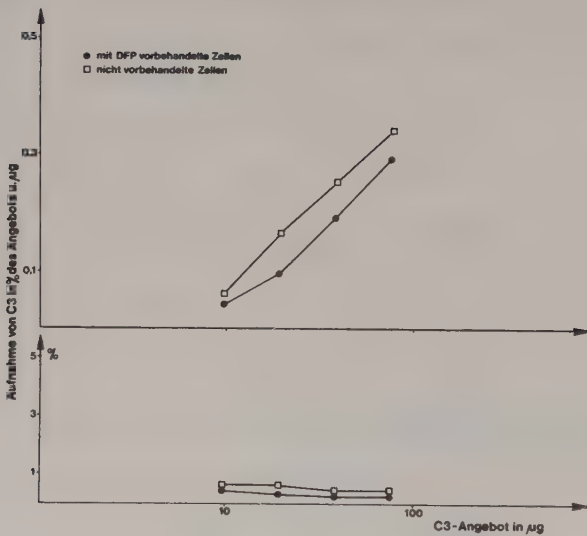


Abb. 24:

Abhängigkeit der C3-Anlagerung an Raji-Zellen von der Vorbehandlung der Raji-Zellmembran mit 1 mM DFP-Lösung.

(Abszisse in logarithmischer Einteilung)

der mit DFP behandelten Zellen bei 47,9 ng C3 ($= 1,43 \times 10^6$ Moleküle C3 pro Zelle). Der prozentuale Anteil der C3-Aufnahme lag bei mit DFP vorbehandelten Zellen zwischen 0,35 % bei hohem C3-Angebot und 0,5 % bei niedrigem Angebot. Ohne DFP vorbehandelte Lymphozyten nahmen dagegen 0,44 % bei hohem und 0,62 % bei niedrigem C3-Angebot auf.

5.2.2. Vorbehandlung der Raji-Zellen mit 0,02 % Glutaraldehyd und einer 1 mM DFP-Lösung (Abb. 25)

Die Glutaraldehydbehandlung der Raji-Zellen wurde durchgeführt, um die Lateralmobilität der C3-Rezeptoren auf der Zellmembran und damit möglicherweise die C3-Aufnahme zu beeinflussen. Die Aktivität des C3 betrug $2,1 \times 10^4$ IPM pro μg C3. Durch das gleichzeitige Einwirken von DFP und Glutaraldehyd auf die Raji-Zellen ließ sich ihre Aufnahmefähigkeit für C3 paradoxerweise beträchtlich steigern. Bei einem Angebot von 38,1 μg C3 nahmen die Raji-Zellen ohne Vorbehandlung 0,2 μg C3 auf. Nachdem DFP und Glutaraldehyd auf sie eingewirkt hatten, erhöhte sich die Aufnahme auf 0,38 μg C3 ($= 1,14 \times 10^7$ Moleküle C3 pro Zelle). Der Unterschied in der angelagerten C3-Menge

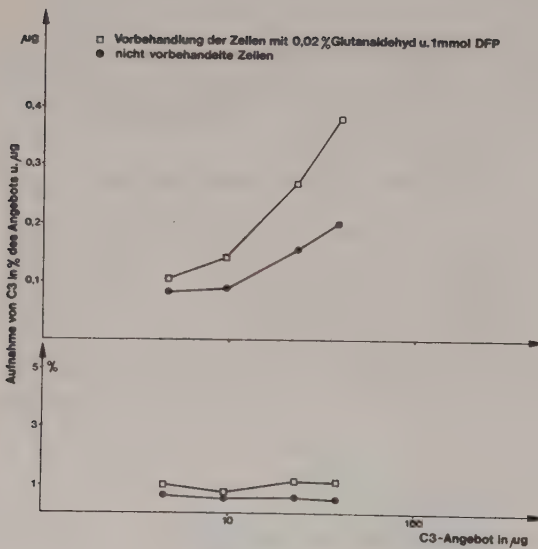


Abb. 25:

C3-Anlagerung an mit 0,02 % Glutaraldehyd und 1 mM DFP-vorbehandelte Raji-Zellen im Vergleich zur Bindung an unbehandelte Raji-Zellen.

(Abszisse in logarithmischer Einteilung)

betrug bei einem C3-Angebot von 9,5 ug 48 ng. Bei einem Angebot von 4,76 ug wurden von den behandelten Zellen 14 ng mehr aufgenommen, was $4,2 \times 10^5$ Moleküle pro Zelle ausmacht.

Der prozentuale Anteil der C3-Aufnahme vom Angebot lag bei mit Glutaraldehyd und DFP vorbehandelten Raji-Zellen bei 1 % und senkte sich bei nicht behandelten Zellen auf ca. 0,6 %.

6. Vergleich von nativem und modifiziertem C3 im Hinblick auf ihren zirkulären Dichroismus (CD-Spektren) und ihre Aminosäurezusammensetzung

6.1. Bestimmung der Sekundärstruktur von C3 mit Hilfe von CD-Spektren

Die Auswertung der CD-Spektren ergab, daß das C3-Protein zu 55,6 % als Random-Coil-Struktur, zu 37 % als β -Form und zu 7,4 % als α -Helix-Form anzusehen ist. Aus diesem großen Random-Coil- und β -Teil muß man auf eine in sich gefaltete, globuläre Struktur des Proteins schließen. Die Messung der CD-Spektren des mit Kaliumbromid (2,5 M) behandelten und mit 200 rad bzw. 1000 rad bestrahlten C3 ergab keine Veränderung gegenüber nativem C3.

Die Untersuchung des CD-Spektrums nach Inkubation der C3-Proben bei verschiedenen Temperaturen (Abb. 26) zeigte, daß die CD-Signale bei steigenden Temperaturen auf allen Wellenlängen abnahmen. Während der Abkühlung des

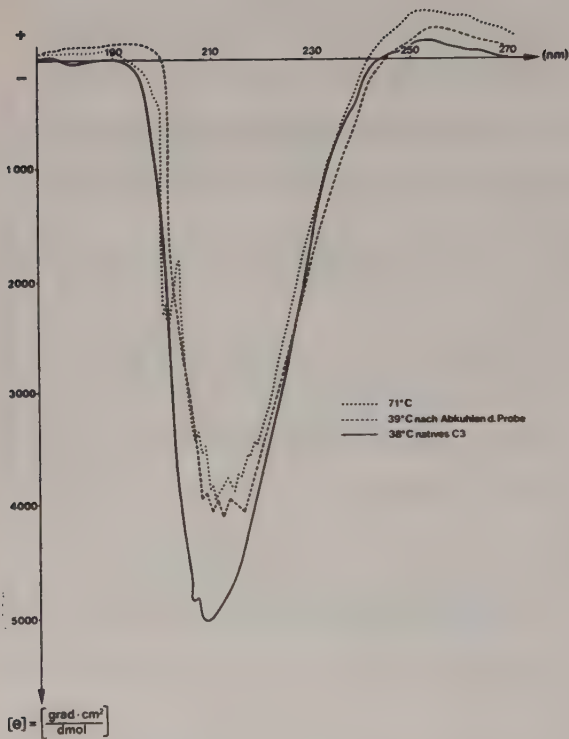


Abb. 26:

Abhängigkeit der CD-Signale des C3-Moleküls bei verschiedenen Wellenlängen vom Grad seiner Hitzedenaturierung

Proteins zeigte sich zwar wieder eine Zunahme der Kurvenhöhe, die aber nicht wieder den Wert von nativem C3 erreichte. Hieraus ist zu entnehmen, daß die Struktur des Proteins bei Erhitzen irreversibel zerstört wird.

6.2. Erstellung einer Aminosäureanalyse von nativem und bestrahltem C3

Die Aminosäureanalyse ergab, daß natives und mit 1000 rad-bestrahltes C3 aus folgenden Aminosäuren zusammengesetzt ist (Abb. 27):

	natives C3	mit 1000rad be- strahltes C3
Asparaginsäure (Asp)	5,15 %	7,85 %
Threonin (Thr)	10,40 %	9,10 %
Serin (Ser)	8,57 %	8,45 %
Glutaminsäure (Glu)	1,17 %	3,31 %
Prolin (Pro)	3,64 %	5,11 %
Glycin (Gly)	5,28 %	6,64 %
Alanin (Ala)	5,32 %	7,45 %
Cystin (Cys)	4,06 %	1,96 %
Valin (Val)	8,95 %	8,37 %
Methionin (Met)	1,36 %	1,49 %
Isoleucin (Iso)	5,90 %	4,71 %
Leucin (Leu)	9,19 %	9,81 %
Tyrosin (Tyr)	3,86 %	3,85 %
Phenylalanin (Phe)	11,56 %	6,85 %
Lysin (Lys)	7,40 %	7,22 %
Histidin (His)	2,09 %	2,14 %
Arginin (Arg)	<u>5,13 %</u>	<u>5,58 %</u>
	99,08 %	99,88 %

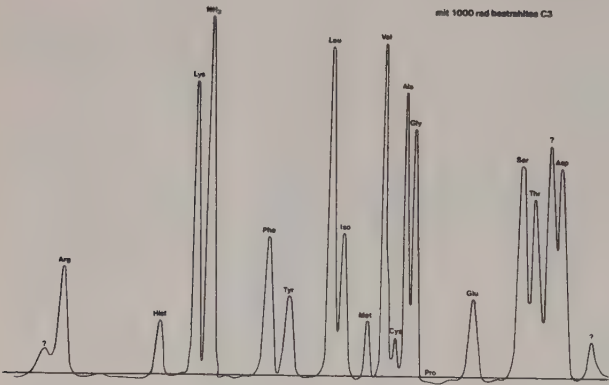
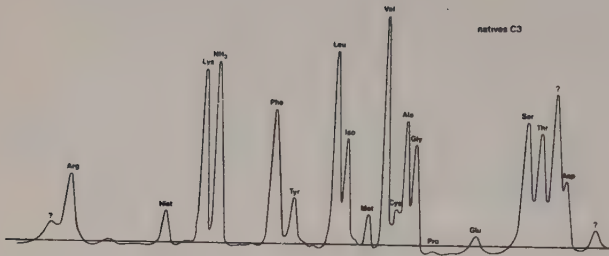


Abb. 27:

Vergleich der Aminosäureanalysen von nativem und mit 1000-rad bestrahltem C3.

Die markantesten Unterschiede im Vergleich der Aminosäureanalysen von nativem und mit 1000 rad bestrahltem C3 zeigten sich bei Glutaminsäure (Zunahme um 2,14 %), Cystin (Abnahme um 2,1 %), Phenylalanin (Abnahme um 4,71 %) und Asparaginsäure (Zunahme um 2,7 %).

E. Diskussion

Anhand der vorgelegten Ergebnisse ließ sich eine Affinitätskonstante für die Bindung von C3 an Lymphoidzellen und an humanen Erythrozyten nicht erstellen, da im Rahmen der Versuche keine Sättigungskurven zu erhalten waren.

Einblicke in die Grundlagen des Bindungsverhaltens von C3 ließen sich jedoch durch Modifikation des C3-Moleküls gewinnen. Durch Behandlung mit Kaliumbromid, Harnstoff, Reduktion und anschließende Alkylierung und durch Bestrahlung mit γ -Strahlen wurde die Fähigkeit des C3-Moleküls, die C3-Rezeptoraktivität auf den Raji-Zellen zu blockieren, deutlich reduziert, auch, wenn dies mit einer gesteigerten Bindung von C3 an die Zelloberfläche einherging. Hitzebehandlung beeinflusste die Rosettenhemmfähigkeit hingegen nicht.

Neben den Modifikationen des C3-Moleküls selbst hatten Veränderungen des Milieus und der Raji-Zellmembran typische Wirkungen auf das Bindungsverhalten. Im folgenden sollen die unterschiedlichen Effekte im einzelnen diskutiert werden.

1. Bindungsstudien mit nativem C3 an Raji-Zellen und humanen Erythrozyten

Um die Anzahl der Bindestellen und die Assoziationskonstante zu berechnen und damit die Gesetzmäßigkeiten zu bestimmen, unter denen die C3-Anlagerung an Raji-Zellen und humanen Erythrozyten abläuft, wurde als erstes versucht, diesen beiden Zelltypen natives C3 anzubieten, um den Umfang der Aufnahme zu messen. Der erste Ansatz

(Variation der Inkubationstemperatur) zeigte, daß sich bereits nach fünf Minuten die maximale C3-Menge eines bestimmten C3-Angebots an die Raji-Zellen (Abb. 1) bzw. die humanen Erythrozyten (Abb. 6) angelagert hatte. Das heißt, daß bereits nach 5-minütiger Inkubation ein "steady-state" zwischen C3-Anlagerung und C3-Abdiffusion bestand. Der Test mit Veränderung der Inkubationstemperatur ergab, daß sich C3 bei 4° C, 20° C, 37° C nach ausreichend langer Inkubationszeit in gleichen Mengenverhältnissen an Erythrozyten sowie an Raji-Zellen anlagerte (Abb. 2 und 7). Diese Unabhängigkeit von den Temperaturen widerspricht den Ergebnissen von Theophilopoulos et al. (138), die bei einer Immunfluoreszenzmarkierung von C3 feststellten, daß nach Inkubation der Raji-Zellen mit diesem C3 bei 4° C 40 % und bei 37° C 100 % der Raji-Zellen fluoreszenzpositiv waren.

Bei der Anlagerung von Insulin (17,41) sowie AMP (44) an den entsprechenden Zellrezeptor wurde ebenfalls eine Temperaturabhängigkeit der Anlagerung festgestellt. Dabei diskutierte man, daß hauptsächlich die spezifische Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor eine solche Temperaturabhängigkeit aufweist, weil der Ligand aufgrund seiner höheren kinetischen Energie bei höheren Temperaturen eher in der Lage ist, seinen spezifischen Bindungsort zu finden. Das würde also bedeuten, daß die von uns beobachtete C3-C3-Rezeptorbindung als mehr unspezifisch anzusehen ist. Betrachtet man den Ansatz bei einer

Inkubationstemperatur von z. B. 37°C (Abb. 2) genauer, so zeigt sich, daß in einem Bereich zwischen 0,17 μg C3 und 66,1 μg C3 als Angebot an die 1×10^5 Raji-Zellen die C3-Aufnahme kontinuierlich zunahm. Diese Beobachtung gilt auch für die Erythrozyten (Abb. 7). Bei einem Angebot von 3,02 μg C3 nahm jede Raji-Zelle $6,0 \times 10^5$ C3-Moleküle auf, und bei einem Angebot von 66,1 μg C3 stieg die pro Zelle aufgenommene Molekülzahl bis auf $1,2 \times 10^7$ an. Diese Art der C3-Bindung an die im Versuch benutzten zwei Zelltypen ließ es nicht zu, von einer C3-Anlagerung zu sprechen, die eine Sättigung der C3-Rezeptoren zur Folge hat. Vielmehr zeigte die Versuchsreihe, daß die Aufnahmefähigkeit der Zelloberfläche für die dritte Komplementkomponente im Rahmen unserer Versuchsbedingungen unbegrenzt war. Unsere Ergebnisse stehen damit im Widerspruch zu dem, was Theophilopoulos et al. (138) in ihrer Arbeit darstellten, nämlich, daß eine Sättigung der C3-Rezeptoren der Raji-Zelle mit 4×10^5 aufgenommenen C3-Molekülen möglich wäre.

Die Anlagerung von Meerschweinchen-C3 zeigte, außer, daß die Raji-Zellen bzw. Erythrozyten mit durchschnittlich 3 % Aufnahme der angebotenen C3-Menge ca. doppelt soviel C3 anlagerten, keine anderen Anlagerungscharakteristika im Vergleich zu humanem C3 (Abb. 4 und 8). Meerschweinchen-C3b wurde in viel geringerer Menge als Meerschweinchen-C3 angelagert. Hier bewegte sich die prozentuale Aufnahme vom Angebot um 0,5 %.

Bei der Anlagerung von $C3b^{hum}$ an humane Erythrozyten stellte sich heraus, daß diese Blutzellen in wesentlich geringerem Ausmaß in der Lage sind, humanes $C3b$ im Vergleich zu ungespaltenem $C3$ aufzunehmen.

Das bedeutet, daß der auf den humanen Erythrozyten nachgewiesene Immunadhärenzrezeptor für $C3b$ (119) eine geringere Affinität zu $C3b$ hat als der $C3$ -Rezeptor humaner Erythrozyten zu $C3$. Dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen, die für Raji-Zellen bezüglich der $C3$ - und $C3b$ -Anlagerung erarbeitet wurden (138).

2. Berechnung der Bindungskonstante von $C3$ an Raji-Zellen

Um die beschriebene Art der Bindung von $C3^{hum}$ an Raji-Zellen genauer zu untersuchen, wurde nach der von Scatchard (117, 122) beschriebenen Methode versucht, die Anzahl der Bindestellen pro Zelle und die Assoziationskonstante zu bestimmen. Unter Einbeziehung aller experimentellen Werte war es aber nicht möglich, im Scatchard-Plot eine Gerade zu zeichnen, die die x- und y-Achse gleichzeitig schneidet. Bei Verknüpfung möglichst vieler Punkte ergab sich vielmehr eine zur x-Achse mehr oder weniger parallele Linie. Die Parallelität des Scatchard-Plots zur x-Achse läßt vermuten, daß die beobachtete Bindung in diesem $C3$ -Konzentrationsbereich unspezifisch ist. Daraus ergibt sich, daß die Dissoziationskonstante der spezifischen Bindung von $C3$ an seinen Rezeptor nicht in dem von uns getesteten Bereich (zwischen 10^{-7} und 10^{-5} (Abb. 9)) liegen kann. Bei diesen experimentellen Befunden läßt sich die Annahme machen, daß die Raji-

Zellen beliebig viele C3-Moleküle aufnehmen können.

Da jedoch die Anlagerung von C3-Molekülen an die Raji-Zellmembran zur Ausbildung von sog. "caps" bzw. "patches" führt (26, 103, 138), wäre es denkbar, daß durch diese lokalen C3-Anhäufungen besondere Bindungsmodalitäten für weitere C3-Moleküle aufgebaut werden, bzw. die Zellmembran der Raji-Zelle von vorne herein die Möglichkeit hat, C3 auf unterschiedlichste Art und Weise zu binden.

Grundsätzlich gibt es z. Z. drei Denkmöglichkeiten, die überschießende C3-Anlagerung an Zellmembranen zu erklären:

1. Die Zelle hat übermäßig viele Bindungsorte unterschiedlichster Natur und unterschiedlichster Affinität.
2. Die C3-Moleküle sind in der Lage, nach Bindung an die Zelloberfläche diese so zu verändern, daß dadurch neue Bindungsorte generiert werden.
3. Nach Anlagerung der C3-Moleküle an die Zelloberfläche werden diese so verändert, daß sie in die Lage versetzt werden, sich mit anderen C3-Molekülen zu assoziieren.

Die erste Möglichkeit scheint sich durch neue Ergebnisse in unserem Labor unterstützen zu lassen, da bisher 3 unterschiedliche Moleküle bekannt geworden sind, die sich einerseits an C3 binden und andererseits auf Zelloberflächen vorkommen (persönliche Mitteilung Prof. Dierich). Diese Beobachtung verwundert nicht, da vom C3-Molekül bekannt ist, daß es auch mit den verschiedensten Faktoren des Komplement-

systems (u.a. C4, β 1H, Properdin, C5) zu reagieren vermag (13, 25, 48, 96, 118, 146).

Für die zweite Annahme besteht bisher kein direkter Hinweis. Da jedoch die Anlagerung von C3-Molekülen zu sog. "caps" und "patches" führt, wäre vorstellbar, daß durch diese deutlichen Membranveränderungen entweder an der Membran insgesamt oder im Bereich der lokalen C3-Ansammlung neue Bindungsqualitäten entstehen.

Für die dritte Denkmöglichkeit gibt es Experimentalbeispiele in der Literatur (18, 66). So konnte von der Gruppe um Cuatrecasas gezeigt werden, daß Hormone nach Bindung an die Zellmembran fähig sind, sich mit weiteren Molekülen desselben Hormons zu assoziieren. Dies führte ebenfalls zu einem nicht auswertbaren Verlauf des Scatchard-Plots.

Ein methodisches Problem ergab sich dadurch, daß, wenn man ideale Versuchsbedingungen zur Bestimmung der Assoziationskonstante zwischen Ligand und Rezeptor bekommen will, man die Rezeptorkonzentration im Ansatz 10 mal niedriger halten sollte als die Dissoziationskonstante ist (66). Um Aussagen über den Dissoziationskonstantenbereich von 10^{-7} und kleiner machen zu können, hätten wir die Rezeptorkonzentration im Ansatz sehr klein halten müssen. Das aber hätte bedeutet, das C3-Molekül mit einer sehr hohen spezifischen Aktivität zu markieren, um meßbare Werte zu erhalten. Diese hohe Markierung war aber aufgrund

der Empfindlichkeit des C3-Moleküls ohne Funktionseinbuße (Abb. 3) nicht zu erreichen, weshalb wir unsere Versuche nicht diesen Erfordernissen entsprechend ausrichten konnten.

3. Untersuchung der Bindung von C3 an C3-tragende Partikel

Der Gedanke der Assoziation von C3 an gebundenes C3 veranlaßte uns, tannisierte Erythrozyten und mit CN-Br-aktivierte Sepharose mit nativem C3 in unterschiedlichen Mengen vorz inkubieren und diesen beladenen Partikeln dann radioaktiv-markiertes C3 anzubieten. Dabei zeigte sich, daß mit unmarkiertem C3 vorinkubierte Sepharose bzw. Erythrozyten nur wenig mehr markiertes C3 aufnahmen als nicht mit C3 beladene Sepharose bzw. Erythrozyten (Abb. 10 und 11). Hierbei muß man jedoch bedenken, daß die C3- Vorinkubation der beschriebenen Materialien eine nicht rezeptorbedingte C3-Aufnahme bewirkte, und daß das "patching" bzw. "capping" an erhaltene Rezeptor- bzw. Membraneigenschaften gebunden ist.

4. Wirkung der Denaturierung von C3 auf sein Bildungsverhalten an Raji-Zellen sowie auf seine Fähigkeiten zur Rosettenhemmung

Ein weiterer Aspekt, der sich aus E.2. ergibt, ist die Frage, ob sich die dauernd steigende Anlagerung von C3 an die Raji-Zellmembran nicht mit Veränderungen des C3-Moleküls (in Richtung einer Denaturierung) erklären läßt. Deswegen versuchten wir, die Auswirkung einer Denaturierung

des C3-Moleküls auf dessen Fähigkeit, sich an den C3-Rezeptor anzulagern, zu klären.

Auf den Gedanken, daß eventuell die radioaktive Markierung der dritten Komplementkomponente Ursache für die Änderung von Moleküleigenschaften ist, kamen wir, als wir Bindungsstudien mit sehr hoch markiertem C3 (spezifische Aktivität 2×10^5 IPM pro μg C3) auswerteten.

Dabei nahmen die 1×10^5 Raji-Zellen 3 Tage nach der Markierung 9 % der angebotenen C3-Menge auf, 6 Tage nach der Markierung lag dieser Prozentsatz im Durchschnitt bei 32 %, und nach weiteren 3 Tagen wurden 40 % der angebotenen C3-Menge angelagert (Abb. 3). Bei all diesen Versuchen nahmen die Raji-Zellen wiederum mit steigendem Angebot mehr C3 auf, so daß sich auch zwischen 0,15 μg C3 und 4,5 μg C3 als Angebot keine Sättigungskinetik feststellen ließ.

Um zu sehen, ob wir nach Denaturierung des C3-Moleküls verstärkt funktionelle Eigenschaften beobachten können, die denen des mit ^{125}J -markiertem C3 gleichen, denaturierten wir unsere C3-Chargen, setzten das denaturierte C3 in Bindungsstudien mit Raji-Zellen ein und testeten seine Fähigkeit, die Rosettenbildung von EAC 1423 und Raji-Zellen zu hemmen. Zur C3-Denaturierung benutzten wir verschiedene Lösungen (Kaliumbromid, Mercaptoäthanol und Jodacetamid sowie Harnstoff, γ -Strahlen und Wärme). Bei diesen Ansätzen wurde auch eine Charge ohne Polyäthylenglykol-präpariertes

C3 eingesetzt, von dem wir nach einer Anlagerungskinetik wußten, daß von ihm durchschnittlich 3 % gegenüber 1,5 % des mit Polyäthylen-präparierten C3 gebunden werden (Resultate nicht gezeigt). Nach Denaturierung des C3-Moleküls mit Kaliumbromid (2,5 M) stellten wir in der Bindungsstudie wiederum eine steigende Zunahme der C3-Anlagerung bei steigendem Angebot fest (Abb. 12). Interessant war dabei, daß sich die Anlagerung von kaliumbromiddenaturiertem C3 insgesamt auf einem höheren Niveau abspielte (10 % des C3-Angebotes wurden an die Raji-Zellen gebunden gegenüber ca. 1 % von nicht denaturiertem C3 (Abb. 12)). Anorganische Salze haben hauptsächlich Einfluß auf die elektrostatischen Eigenschaften von Proteinen. Dadurch haben denaturierende Salzkonzentrationen eine veränderte Molekülstruktur zur Folge (meist eine Vermehrung der globulären Strukturanteile (140)). Außerdem wird durch die Ladungsveränderung an der Proteinoberfläche die Beziehung dieser Moleküle zu umgebenden Lösungsmedien bzw. zu anderen Reaktionspartnern verändert (121, 144). Die Tatsache, daß die Kaliumbromiddenaturierung eine um das Zehnfache ansteigende Bindung des C3-Moleküls an die Raji-Zelle bewirkt, impliziert, daß diese steigende Anlagerung hauptsächlich durch ionale (hydrophile) Bindungen bewirkt wird. Im Rosettenhemmtest zeigte sich, daß das mit Kaliumbromid behandelte C3 nicht mehr imstande war, die Rosettenbildung zu hemmen (Abb. 13). Das bedeutet aber, daß sich dieses

denaturierte C3 zwar vermehrt an die Raji-Zellmembran anlagern konnte, jedoch nicht mehr in der Lage war, die Rezeptorbindestellen zu besetzen. Es wurde zwar vermehrt, aber unspezifisch an die Raji-Zelle angelagert.

Als nächstes, denaturiertes Reagenz wurde Mercaptoäthanol eingesetzt. Dieser Thioalkohol bewirkt hauptsächlich eine Spaltung von Disulfidbrücken. Wie in der Einleitung beschrieben, besteht C3 aus zwei Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die Spaltung dieser Disulfidbrücken wurde in unserem Ansatz durch die anschließende Zugabe einer einmolaren Jodacetamidlösung durch Acetylierung des Schwefels manifestiert. Aus der Literatur ist bekannt, daß die Aufspaltung der Disulfidbrücken, besonders bei mehr globulären Proteinen, wie dem C3-Molekül (s. Ergebnisse 6), zu einem Ansteigen der Molekülgröße, zur Aggregation und zur Erhöhung der Viskosität der Proteinlösung führt (154). Bei unseren Ansätzen konnten wir feststellen, daß eine C3-Charge, nämlich die, die ohne Polyäthylenglykol präpariert worden war, nach der Behandlung mit Jodacetamid so stark aggregierte, daß das Protein ausfiel. Dieses Phänomen trat bei polyäthylenglykolbehandeltem C3 nicht auf. Bei der Bindungsstudie, die wir mit dem denaturierten C3 anfertigten, sahen wir wiederum eine stetige Zunahme der C3-Anlagerung bei steigendem Angebot (Abb. 12).

Es ergab sich dabei, daß bei höchstem Angebot pro Lymphozyt $8,01 \times 10^9$ C3-Moleküle gebunden wurden, was uns zuerst vermuten ließ, aggregiertes, nicht gebundenes C3 abzentri-

fugiert und mitgemessen zu haben. Dies schlossen wir aber in einem zweiten Ansatz dadurch aus, daß wir eine Lösung von denaturiertem C3 gleicher Konzentration zentrifugierten. Der Überstand dieses Zentrifugates wurde abgesaugt, und dann wurde kontrolliert, ob sich vermehrt Radioaktivität im Eppendorfhütchen nachweisen ließ. Dies war nicht der Fall, so daß wir annehmen mußten, bei dem Ansatz mit Raji-Zellen nur gebundenes C3 gemessen zu haben. Wenn man voraussetzt, daß die Raji-Zelle einen Durchmesser von 12 μ m hat und die Bindestelle des C3-Moleküls einer zylindrischen Region mit einem Durchmesser von 20 $\text{\AA}$ entspricht, so könnte man pro Lymphozyt maximal $1,5 \times 10^8$ C3 Moleküle binden. Die Tatsache, daß wir mehr als die 10-fache Menge anlagern konnten, erklärt sich vielleicht dadurch, daß sich einmal so denaturiertes C3 an sich selbst anlagert, oder dadurch, daß die Lymphozyten mit Hilfe ihrer "pseudopodienartigen Ausstülpungen" ihre Oberfläche um das Mehrfache vergrößern können. Wahrscheinlich sind beide Faktoren an dieser enormen Steigerung der C3-Aufnahme nach Mercaptoäthanol- und Jodacetamid-denaturierung beteiligt.

Das so denaturierte C3 war wiederum nicht in der Lage, die Rosettenbildung zwischen EAC 1423 und Raji-Zellen zu beeinflussen, so daß eine sehr starke, aber unspezifische Anlagerung des denaturierten C3 an die Raji-Zellen angenommen werden muß (Abb. 13).

Bei dem durch Harnstoff denaturierten C3 ließen sich ähnliche Veränderungen bezüglich der getesteten, funktionellen Seiten feststellen, wie bei dem durch Kaliumbromid denaturierten C3. Das bedeutet, daß die angelagerte C3-Menge bei steigendem Angebot stetig zunahm. Der prozentuale Anteil der C3-Aufnahme vom Angebot bewegte sich hier aber nur um 5,6 % (Abb. 12), was unterstreicht, daß durch Beeinflussung der Ladungsverhältnisse des C3-Moleküls durch Kaliumbromid eher die Bindungsmodalitäten zu verändern sind als durch bloße Strukturabwandlungen, wie es vornehmlich durch Harnstoff geschieht (s. a. A.2.). Außerdem ließ sich die Rosettenbildung durch harnstoffdenaturiertes C3 etwas besser hemmen als durch kaliumbromiddenaturiertes C3 (Abb. 13), was als Ausdruck einer stärkeren Beeinflußbarkeit der C3-C3-Rezeptorbindung durch ionale Kräfte zu werten ist. Weiter muß man berücksichtigen, daß Proteine sehr unterschiedlich auf Harnstoff reagieren und oftmals noch eine relativ große Spezifität auch bei starker Harnstoffeinwirkung bewahren (57, 72, 134). Das kaliumbromid- und harnstoffdenaturierte, ohne Polyäthylenglykol präparierte C3 zeigte qualitativ dieselben Eigenschaften wie das mit Polyäthylenglykol präparierte C3. Diese Versuche mit denaturierten Lösungen zeigen, daß die in der Einleitung (Kap. 2) beschriebene häufige Zunahme der Fähigkeit von denaturierten Proteinen, Bindungen mit anderen Substanzen einzugehen, auch für C3 unter den beschriebenen Bedingungen zutrifft, daß aber die Bindung, wie aus dem Rosettentest zu ersehen ist, unspezifisch ist.

Demnach ist es also unter Vorbehalt möglich, das Ausmaß der C3-Anlagerung als Grad der Beeinflussung des Moleküls durch denaturierende Substanzen zu werten.

Als nächstes wurde die dritte Komplementkomponente einer Behandlung mit γ -Strahlen ausgesetzt. Dazu wurden Strahlendosen von 10 rad, 200 rad und 1000 rad eingesetzt. In den Bindungsstudien zeigte das so behandelte C3 keine Veränderung bezüglich der Anlagerung im Vergleich zu nativem C3. In allen drei Fällen wurde knapp unter 1 % der angebotenen C3-Menge gebunden (Abb. 14). Der Rosettentest zeigte aber, daß mit 200- und 1000 rad bestrahltes C3 nicht mehr in dem Maße die Fähigkeit besaß, die Rosettenbildung zu hemmen wie natives C3 (Abb. 15). (Mit 200- und 1000 rad bestrahltes C3 ließ durchschnittlich doppelt soviel Rosetten entstehen wie natives C3). Das heißt, daß durch γ -Strahlen denaturiertes C3 zunehmend die Fähigkeit verliert, sich an den C3-Rezeptor zu binden, sich aber andererseits nicht im Übermaß an die Zellmembran anlagert. Dieses Ergebnis läßt sich gut mit Literaturangaben in Einklang bringen, wo hauptsächlich auf die Beeinträchtigung der biologischen Aktivität von Enzymen nach deren Bestrahlung hingewiesen wird (126, 129). Auch hier wurde bei den ohne Polyäthylenglykol präparierten C3-Chargen keine anderen Versuchsergebnisse nach Bestrahlung erzielt.

In der nächsten Versuchsreihe wurde der Einfluß von Hitze auf das C3-Molekül getestet. Dabei ließ sich das ohne Polyäthylenglykol präparierte C3 nicht austesten, da es während

der Erhitzung auf 62° C bzw. 100° C ausfiel. Diese Zustandsänderung wird auch bei anderen Proteinen nach Erhitzung, besonders bei hohen Proteinkonzentrationen, häufig beobachtet (57). Das mit Polyäthylenglykol präparierte C3 zeigte weder offensichtliche Strukturveränderungen, noch verhielt es sich bezüglich der Anlagerung an die Zellmembran von Raji-Zellen oder der Rosettenhemmung anders als natives C3 (Abb. 16 und 17). Das heißt, daß wir keine Möglichkeit hatten, mit unserem Testsystem Aussagen über die Qualität der C3-Denaturierung durch Erhitzen zu machen.

Mit pH 2-bzw. pH 12-denaturiertes C3 wurde von uns nur auf seine Fähigkeit getestet, die Rosettenbildung zu hemmen. Dabei zeigte sich, daß das basisch denaturierte C3 schlechter imstande war, die Rosettenbildung zu hemmen als durch Säure denaturiertes C3 (Abb. 18). Das heißt, daß letzteres seine Rezeptorspezifität weiter beibehielt. Auf pH-Denaturierung reagieren die meisten Proteine sehr unterschiedlich (1, 134, 151, 154). Interessant ist aber, daß besonders basische pH-Werte die Disulfidbrücken stark beeinflussen (10, 57, 134). Der gezielte Angriff auf die Disulfidbrücken des C3-Moleküls mag dessen schlechte Fähigkeit zur Rosettenhemmung nach Behandlung mit stark basischen Lösungen erklären. Andererseits zeigen Versuche (E.4.1.1. und 4.2.1.), daß auch bei den Bindungsstudien ein basischer pH-Wert im Inkubationsmilieu eine bessere Anlagerung des C3 an die Raji-Zellen ermöglicht (bei einem pH-Wert von 7,5 wurden 1,2 % der angebotenen C3-Menge gebunden und bei einem

pH-Wert von 8,5 2,0 %). Das bedeutet, daß die spezifischen Ladungsveränderungen durch basische pH-Werte bei dem C3-Molekül für ähnliche, funktionelle Veränderungen sorgen, wie wir sie bei der Denaturierung durch Kaliumbromid zeigen konnten.

5. Bindungsstudien unter veränderten Milieubedingungen sowie nach Veränderung der Membraneigenschaften von Raji-Zellen

Weitere Versuche sollten zeigen, ob Milieuveränderungen, was pH-Wert und Salzkonzentration betrifft, einen Einfluß auf die Interaktion zwischen C3 und C3-Rezeptor haben. Dabei wurde die C3-Anlagerung an die Raji-Zellen und humanen Erythrozyten untersucht. Wie in der Einleitung bereits beschrieben, beeinflussen Veränderungen der Wasserstoffionenkonzentration hauptsächlich über Ladungsveränderungen die funktionelle Integrität von Proteinen (57, 112, 134). Die Variation der Salzkonzentration im Inkubationsmedium wird hauptsächlich die Molekülstruktur verändern (z. B. wird anstatt der helikalen Proteinstruktur bei großer Ionenstärke eine Umlagerung zu der mehr kompakteren, globulären Struktur erfolgen (140)). Wie schon erwähnt, soll aber nochmals festgehalten werden, daß niedrige Salzkonzentrationen Proteine vor elektrostatisch bedingten Denaturierungerscheinungen schützen können (134, 144). Eine kontinuierliche Veränderung des pH-Wertes im Reaktionsmilieu von pH 6,5 in 0,5 Schritten bis pH 8,5 ließ erkennen, daß im alkalischen Bereich die C3-Aufnahme der Zellmembran verbessert war.

Hier wurden 2,1 % der angebotenen C3-Menge angelagert, wogegen bei einem pH-Wert von 6,5 nur ca. 1 % der angebotenen C3-Menge aufgenommen wurde (Abb. 19 und 21). Bei der Veränderung der Salzkonzentration im Inkubationsmilieu zeigte sich, daß 0,077 bis 0,254 M NaCl-Lösungen die Anlagerung von C3 an Raji-Zellen bzw. Erythrozyten nicht wesentlich beeinflussen. Erst NaCl-Konzentrationen von 0,484 bis 0,654 M lassen die C3-Anlagerung an beide Zelltypen stark absinken (Abb. 20 und 22). Von niedriger zu hoher NaCl-Konzentration im Ansatz sank der Anteil der C3-Aufnahme vom C3-Angebot bei beiden Zellarten um durchschnittlich 1 %. Durch diese Ansätze wird wiederum die Verletzbarkeit der Interaktion C3-C3-Rezeptor durch andere Ladungskomponenten offensichtlich. Um nach weiteren Gründen zu fahnden, die für die kontinuierliche Zunahme der C3-Anlagerung an Raji-Zellen verantwortlich sein könnten, versuchten wir, verschiedene Membraneigenschaften experimentell zu verändern, um zu untersuchen, welchen Einfluß diese Faktoren auf die Anlagerung von C3 haben.

Um auf Raji-Zellmembranen möglicherweise vorhandene Proteasen zu hemmen, die für eine Spaltung des den Raji-Zellen angebotenen C3 und damit für die Anlagerung von C3b über die labile Bindungsgruppe verantwortlich sein könnten (25), wurden die Raji-Zellen mit einer 1 mM DFP-Lösung vorinkubiert. Es zeigte sich bei dieser Anlagerungsstudie, daß die C3-Aufnahme im Vergleich zu den nicht behandelten Zellen um 25 % sank (Abb. 24). Aber auch durch diese Hemmung ließ sich keine

Sättigungskinetik für die Bindung von C3 an die Raji-Zellen erkennen. Da, wie in der Einleitung dargelegt wurde, die integralen Proteine aufgrund der Fließeigenschaften der Zellmembran in der Lage sind, sich auf der Membran mehr oder weniger zu konzentrieren und dadurch die Bindung von C3 zu beeinflussen, wurde weiter versucht, diese Lateralmobilität der integralen Proteine durch Glutaraldehyd zu verhindern. Gleichzeitig wurden die Raji-Zellen mit 1 mM DFP behandelt, um auch hier eine erhöhte Aktivitätsaufnahme der Raji-Zellen aufgrund der Anlagerung von C3b (s. oben) zu verhindern. Der Ansatz unter diesen Bedingungen zeigte eine Erhöhung der C3-Aufnahme auf das Doppelte gegenüber unbehandelten Zellen (Abb. 25). Das läßt darauf schließen, daß auf der Membran fixierte und gleichmäßig verteilte C3-Bindestellen eine noch höhere Aufnahmefähigkeit für die dritte Komplementkomponente haben. Eine Sättigung der Raji-Zellen mit C3 war auch hier nicht möglich.

Unter Novocain-Einfluß war die C3-Aufnahme der Raji-Zellen leicht verschlechtert (Abb. 23). Erst bei Novocainkonzentrationen unter 3×10^{-4} M erreichte die angelagerte C3-Menge die ohne Novocainbehandlung der Zellen gewohnten Werte. Über den Mechanismus, durch den Novocain die C3-Anlagerung an Zellmembranen hemmt, ist noch nichts bekannt.

6. Bestimmung der Sekundärstruktur von C3 durch Messung seiner CD-Signale und Erstellung einer Aminosäureanalyse von nativem und denaturiertem C3

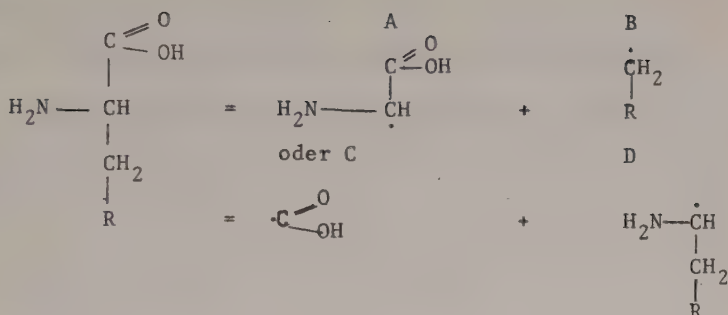
Wie schon in der Einleitung beschrieben, ist das C3-Molekül aus zwei Peptidketten (α -Kette MG = 120 000; β -Kette

MG = 75 000), die über drei Disulfidbrücken und nicht kovalente Bindungen zusammengehalten werden, aufgebaut (6). Die Bestimmung der Sekundärstruktur mit Hilfe von CD-Spektren ergab, daß C3 zu 55,6 % eine "random-coil" (d. h. globuläre) Struktur, zu 37 % eine Faltblattstruktur und zu 7,4 % eine α -Helixform aufweist (s. E.6). Diese Ergebnisse stimmen mit in der Literatur für C3 angegebenen Werten überein (90). Die Messung der CD-Signale des kaliumbro-middenaturierten C3 zeigte keine Veränderung gegenüber nativem C3. Das gleiche gilt für C3, das mit 200 bzw. 1000 rad bestrahlt wurde. Die Untersuchung der CD-Signale nach Inkubation des C3-Proteins bei verschiedenen Temperaturen ergab, daß die Höhe der Ausschläge bei steigenden Temperaturen auf allen Wellenlängen abnahm. Während der Abkühlung der Proteinlösung nahm die Peakhöhe bei den einzelnen Wellenlängen zwar wieder zu, erreichte aber in keinem Fall wieder die Höhe, die bei nativem C3 gemessen worden war. Daraus ließ sich eine irreversible Zerstörung der Proteinstruktur durch Erhitzen ableiten.

In der Literatur sind von Kauzmann et al. (57) sowie von Jirgensons B. et al. (55) ähnliche Ergebnisse für verschiedenste Proteine bezüglich der CD-Spektren nach Temperaturdenaturierung beschrieben worden. Für Pepsin z. B. wird ebenfalls mit steigender Temperatur eine Abnahme der CD-Signale festgestellt. Hier zeigte sich die Irreversibilität des Denaturierungsvorganges auch durch eine bleibende Verminderung der CD-Signale nach Abkühlung der Proteinlösung.

Jirgensons B. (54) stellt weiterhin bezüglich der Reversibilität von Denaturierungserscheinungen fest, daß man auch nach Wiedereinbringen des denaturierten Proteins in physiologische Verhältnisse meist eine bleibende, d. h. irreversible Veränderung mit Hilfe des CD-Spektrums, erkennen kann. Das heißt, daß, wenn Veränderungen des C3-Moleküls während des Denaturierungsvorganges mit Kaliumbromid oder γ -Strahlen eintreten, die mit Hilfe der CD-Spektren hätten nachgewiesen werden können, diese Erscheinungen auch mit großer Wahrscheinlichkeit nach Abschluß der Denaturierung bei unseren Proben festzustellen gewesen wären. Daraus ist zu schließen, daß Kaliumbromid und γ -Strahlen zur Veränderung des C3-Moleküls führen, die nicht mit Hilfe des CD-Spektrums erfaßbar sind. Der Vergleich der Aminosäureanalyse von nativem- und mit 1000 rad-bestrahltem C3 zeigte bei fast allen Aminosäuren Unterschiede betreffs ihres prozentualen Anteils am Gesamtprotein (s. E.7. und Abb. 27). Ähnliche Ergebnisse bezüglich der Bestrahlung anderer Proteine wurden auch von Liebster J. und Kopoldova J. (73) beschrieben. Die wohl zugrundeliegende Reaktion, die zur Abwandlung von Aminosäuren nach Bestrahlung führt, ist die Spaltung eines Aminosäuremoleküls in radikalische Bruchstücke.

Beispiel:



Diese Aminosäurebruchstücke verbinden sich wieder und bilden Moleküle unterschiedlicher Zusammensetzung, die ihren Aminosäurecharakter häufig behalten. Zum Beispiel würde die Rekombination von Bruchstück A und C eine Monoaminodicarbonsäure ergeben, von A und D eine Diaminomonocarbonsäure, von B und C eine Carbonsäure und von B und D ein Amin. Aus dieser Vielfalt der Möglichkeiten läßt sich die anteilmäßige Veränderung fast aller Aminosäuren des C3-Moleküls nach Bestrahlung erklären. Für aromatische Aminosäuren wird nach Bestrahlung fast immer eine Konzentrationsverminderung festgestellt, da durch Hydroxylisierung des aromatischen Ringes bei diesen Aminosäuren eine Abwandlung des Moleküls erfolgt. Diese Befunde erklären auch die starke Konzentrationsabnahme von Phenylalanin (um 4,7 %) nach Bestrahlung.

7. Schlußfolgerung

Ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit war, daß sich die Beziehung zwischen C3 und C3-Rezeptor nicht durch ein einfaches Gleichgewicht zwischen einem Liganden und einer spezifischen Bindestelle beschreiben läßt. Die Denaturierungsversuche und Bindungsstudien bei Milieuveränderung zeigen weiter, daß die Bindung von C3 an seinen Rezeptor stark von bestimmten Ladungskonstellationen abhängig ist. Daß C3 starke Einflüsse auf die elektrostatische Integrität von Zellmembranen hat, wurde bereits von van Oss et al. und Okada et al. (106, 142) beschrieben. Dies bedeutet, daß Substrate, die Einfluß auf die Ladungsverteilung des C3-Moleküls nehmen, schon in geringen Mengen die Interaktion zwischen C3 und C3-Rezeptor stören können. Aus alledem läßt sich schließen, daß das Zusammenspiel zwischen der dritten Komplementkomponente und ihrem Rezeptor ein sehr störanfälliger und komplizierter Vorgang ist, den es aber aufgrund seiner großen biologischen Relevanz weiter zu klären gilt.

F. Zusammenfassung

Um die Dissoziationskonstante für C3 an verschiedene Zelltypen bestimmen zu können, mußten wir zuerst versuchen, die Zeit-, Dosis- und Temperaturabhängigkeit der C3-Anlagerung an den C3-Rezeptor genau zu erfassen. Dabei konnten wir feststellen, daß sich nach 5 Minuten ein temperaturunabhängiges "steady-state" der Interaktion C3 C3-Rezeptor eingestellt hatte. Andererseits wurde aber auch klar, daß sich im Bereich zwischen $6,0 \times 10^4$ und $1,2 \times 10^7$ C3-Molekülen pro Raji-Zelle keine Sättigung der Rezeptoren pro Zelle erkennen ließ. Das gleiche galt auch für Erythrozyten, die im Bereich zwischen $2,16 \times 10^6$ und $2,17 \times 10^7$ Molekülen pro Zelle mit C3 nicht sättigbar waren. Vielmehr ließ sich zeigen, daß diese beiden Zelltypen mit steigendem Angebot mehr C3 aufnahmen. Diese Tatsache führte auch dazu, daß sich mit Hilfe des Scatchard-Plots keine Dissoziationskonstante für den getesteten Bereich berechnen ließ.

Weiter untersuchten wir die Frage, ob C3 vermehrt an sich selbst oder an die Zellmembran direkt gebunden wird. Die Anlagerungsversuche von $^{125}\text{J-C3}$ an mit C3-vorinkubierten, tannisierten Schafserythrozyten bzw. CN-Br-aktivierter Sepharose ergab jedoch keinen Anhalt für eine verstärkte C3-Anlagerung an mit C3 besetzten Zellmembranen.

Um Membraneigenschaften, wie die Lateralmobilität bzw. die Funktion von Membranproteasen zu beeinflussen, wurden dann die im Ansatz benutzten Raji-Zellen mit DFP bzw. mit Glutaraldehyd vorbehandelt. Aber auch dadurch ließ sich die kontinuierliche Zunahme der C3-Anlagerung nicht stoppen. Es zeigte sich nur, daß Zellmembranproteasen für ca. 25 % der Aktivitätsaufnahme verantwortlich sind.

Um nun den zweiten Reaktionspartner, die dritte Komplementkomponente, genauer zu untersuchen, denaturierten wir das C3-Molekül auf verschiedene Art und Weise. Dadurch sollten Einflüsse aufgedeckt werden, die die Interaktion zwischen C3 und Rezeptor entweder begünstigen oder behindern. Es stellte sich heraus, daß mit Harnstoff-, Kaliumbromid- und Mercaptoäthanol sowie Jodacetamid-denaturiertes C3 kaum in der Lage war, die Rosettenbildung zwischen Raji-Zellen und EAC 1423 zu hemmen. Das mit γ -Strahlen behandelte C3 band sich zwar nicht vermehrt an Raji-Zellen, war aber auch bei einer Bestrahlungsdosis von 1000 rad nicht mehr in der Lage, die Rosettenbildung zu hemmen. Hitzedenaturiertes C3 veränderte seine Bindungseigenschaften an Raji-Zellen gegenüber nativem C3 nicht. Wie sich im Rosettenhemmtest zeigte, lagert sich alkalisch denaturiertes C3 nicht mehr an seinen spezifischen Rezeptor auf der Raji-Zellmembran an, wogegen mit pH 2-denaturiertes C3 seine spezifischen Eigenschaften nicht in demselben

Maße verlor. Bei Veränderung des Reaktionsmediums, in dem sich C3 an den Zellrezeptor anlagerte, ergab sich, daß C3 in alkalischem pH-Wert und bei geringer Ionenstärke besser an seinen Rezeptor zu binden war.

Die Bestimmung der Sekundärstruktur des C3-Moleküls über CD-Spektren ließ einen hohen Random-coil Anteil an der Gesamtstruktur des C3-Moleküls erkennen. Entscheidend ließen sich die CD-Signale nur durch Hitzedenaturierung verändern. Die Aminosäureanalyse zeigte starke Unterschiede zwischen nativem und mit 1000 rad bestrahltem C3.

Aus den Untersuchungen ist abschließend zu folgern, daß es sich bei der Reaktion C3-Zellmembran um einen zu komplexen Vorgang handelt, als daß man ihn mit dem Modell zweier Reaktionspartner, nämlich dem C3-Molekül und einem spezifischen Rezeptor, beschreiben könnte.

Literaturverzeichnis

1. Acampora, G.; Herman, S.J.: Reversible denaturation of sperm whale myoglobin. I.: Dependence on temperature, pH and composition.
J. Am. Chem. Soc. 89 (1967) 1543.
2. Alper, C.A.; Colten, H.R.; Rosen, F.S.; Rabson, A.R.; Macnab, G.M.; Gear, J.S.S.: Homozygous deficiency of C3 in a patient with repeated infections.
Lancet 2, 1179.
3. Augener, W.; Grey, H.M.; Cooper, N.R.; Müller-Eberhard, H.J.: The reaction of monomeric and aggregated immunoglobulins with C1.
Immunochemistry 8 (1971) 1011.
4. Beychok, S.: Circular dichroism of biological macromolecules.
Science 154 (1966) 1288.
5. Bianco, C.; Patrick, R.; Nussenzweig, V.: A population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody-complement-complexes. I.: Separation and characterization.
J. Exp. Med. 132 (1970) 702.
6. Bokisch, V.A.; Dierich, M.P.; Müller-Eberhard, H.J.: Third component of complement (C3). Structural properties in relation to function.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72 (1975) 1989.
7. Bokisch, V.A.; Müller-Eberhard, H.J.; Cochrane, C.G.: Isolation of a fragment (C3) of the third component of human complement containing anaphylatoxin, a chemotactic activity and description of an anaphylatoxin inactivator of human serum.
J. Exp. Med. 129 (1969) 1109.

8. Bolton, A.E.; Hunter, W.M.: The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a ^{125}J -containing acylatin agent.
Biochem. J. 133 (1973) 529.
9. Brand, E.: Über das Verhalten der Komplemente bei der Dialyse.
Berlin. Klin. Wochenschr. 44 (1907) 1075.
10. Cecil, R.; McPhee, J.R.: The sulfur chemistry of proteins.
Adv. Protein Chem. 14 (1956) 256.
11. Cohen, C.: Optical rotation of polypeptide chain configuration in proteins.
Nature Lond. 175 (1955) 129.
12. Cooper, N.R.; Müller-Eberhard, H.J.: The reaction mechanism of human C5 in immune hemolysis.
J. Exp. Med. 132 (1970) 775.
13. Cooper, N.R.: Immune adherence by the fourth component of complement.
Science 165 (1969) 396.
14. Crabbe, P.: Optical rotatory dispersion and circular dichroism in organic chemistry (Ed. by Holden Day, San Francisco, London, Amsterdam (1965)).
15. Cuatrecasas, P.: Affinity, chromatography and purification of the insulin receptor of liver cell membranes.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69 (1972) 1277.
16. Cuatrecasas, P.: Isolation of the insulin receptor of liver and fat cell membranes.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69 (1972) 318.
17. Cuatrecasas, P.: Properties of the insulin receptor of isolated fat cell membranes.
J. Biol. Chem. 246 (1971) 7265.

18. Cuatrecasas, P.; Hollenberg, M.D.: Binding of insulin and other hormones to non-receptor materials: Saturability, specificity and apparent negative cooperativity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 62 (1975) 31.
19. Danielli, J.F.; Davson, H.: A contribution to the theory of permeability of thin films. *J. Cell. Com. Physiol.* 5 (1935) 595.
20. Danielli, J.F.; Davson, H.: The permeability of nature membranes. Cambridge University Press, Cambridge (1943).
21. Dias da Silva; Cusele, J.W.; Lepow, J.H.: Complement as a mediator in inflammation. III.: Purification of the activity with anaphylatoxin properties generated by interaction of the first four components of complement and its identification as a cleavage product of C3. *J. Exp. Med.* 126 (1967) 1027.
22. Diener, E.; Peatkau, V.H.: Antigen recognition: Early surface-receptor phenomena induced by binding of a tritium-labelled antigen. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69 (1972) 2364.
23. Dierich, M.P.: Über die Wechselwirkungen zwischen Fragmenten der dritten Komplementkomponente und besonderen Arealen der Zellmembran: Funktionelle und biochemische Charakterisierung der Reaktionspartner. Habilitationsschrift, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz (1976).
24. Dierich, M.P.; Bokisch, V.A.: Receptor-binding sites on C3 and C3b. *J. Immunol.* 118 (1977) 2145.

25. Dierich, M.P.; Landen, B.: Complement bridges between cells. Analysis of a possible cell-cell interaction mechanism.
J. Exp. Med. 146 (1977) 1484.
26. Dierich, M.P.; Reisfeld, R.A.: C3-mediated cytoadherence. Formation of C3-receptor aggregated as prerequisites for cell attachment.
J. Exp. Med. 142 (1975) 242.
27. Dose, K.: Korrelation zwischen Inaktivierung und Bruch von Disulfidbrücken bei der Bestrahlung von Proteinen. In: Molekulare Struktur und Strahlenwirkung, Thieme-Verlag, Stuttgart (1968).
28. Dukor, P.; Schuman, G.; Dierich, M.P.; König, W.; Hadding, V.; Bitter-Suermann, D.: Complement-dependent β -cells-activation by cobra-venom-factor and other mitogens.
J. Exp. Med. 139 (1973) 337.
29. Dukor, P.; Hartmann, K.H.: Bound C3 as the second signal for β -cells-activation.
Cell. Immunol. 7 (1973) 349.
30. Dunham, E.K.; Unanue, E.R.; Benacerraf, B.: Antigen binding and capping by lymphocytes of genetic non-responder mice.
J. Exp. Med. 136 (1972) 403.
31. Ehrenberger, A.G.; Nussenzweig, V.: The role of membrane receptors for C3b and C3d in phagocytosis.
J. Exp. Med. 145 (1977) 357.
32. Ehrlich, P.: Chemotherapeutics: Scientific principles, methods and results.
The Lancet 2 (1913) 445.

33. Ehrlich, P.: Über die Beziehungen von chemischer Konstitution, Verteilung und pharmakologischer Wirkung.
In: Collected Papers of Paul Ehrlich (Ed. by Himmelweit, Vol. I. S. 570, London, New York, Pergamon Press (1956)).
34. Ehrlich, P.: Über Partialfunktionen der Zellen (Nobel-Vortrag).
In: Paul Ehrlich: Gesammelte Arbeiten (Ed. by Himmelweit, Bd. III, S. 171, Springer-Verlag, Berlin (1957)).
35. Ehrlich, P.; Morgenroth, J.: Über Hämolyse.
Berlin. Klin. Wochenschr. 36 (1899) 481.
36. Ehrlich, P.; Morgenroth, J.: Über Hämolyse.
Berlin. Klin. Wochenschr. 37 (1900) 453.
37. Fearon, D.T.; Austen, K.F.: Initiation of C3-cleavage in the alternative complement pathway.
J. Immunol. 115 (1975) 1357.
38. Ferrata, A.: Die Unwirksamkeit der komplexen Hämolsine in salzfreien Lösungen und ihre Ursache.
Berlin. Klin. Wochenschr. 366 (1907).
39. Forster, J.F.: In: The plasma proteins (Ed. by F.W. Putnam, Academic Press, New York, S. 179 (1960)).
40. Forster, J.F.; Samsa, E.G.: Streaming orientation studies on denatured proteins. III.: Denaturation of proteins in the presence of urea.
J. Am. Chem. Soc. 73 (1951).
41. Freychet, P.; Roth, J.; Neville, P.M.: Insulin receptors in the liver: Specific binding of ¹²⁵Jod-Insulin to the plasma-membrane and its relation to bioactivity.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68 (1971) 1833.

42. Gigli, J.; Nelson, R.A.: Complement-dependent phagocytosis. I.: Requirements C1, C4, C2, C3.
Exp. Cell Res. 51 (1968) 45.
43. Goldstein, A.; Arnow, L.; Kallman, S.M.: Molecular mechanisms of drug action. In: Principles of drug action; The basis of pharmacology, 2nd ed., S. 1, John Wiley and Sons, New York, London (1975).
44. Gordon, N.G.; Gordon, M.W.: The detection and characterization of cyclic AMP receptor protein in animal cells. Meth. of Enzym. 36 (1975) 376.
45. Gordon, J.; Whitehead, H.R.; Wormall, A.: The action of amonia on complement. The fourth component. Biochem. J. (Brits.) 20 (1926) 1028.
46. Gorter, E.; Grendel, F.: On bimolecular layers of lipoid on the chromocytes of the blood.
J. Exp. Med. 41 (1925) 439.
47. Götze, O.; Müller-Eberhard, H.J.: Lysis of erythrocytes by complement in absence of antibody.
J. Exp. Med. 132 (1970) 898.
48. Götze, O., Müller-Eberhard, H.J.: The role of properdin in the alternative pathway of complement activation.
J. Exp. Med. 139 (1974) 44.
49. Hartmann, K.U.; Bokisch, V.A.: Stimulation of murine B-lymphocytes by isolated C3b.
J. Exp. Med. 142 (1975) 600.
50. Haurowitz, F.; Di Moia, F.; Tekuran, S.: The reaction of native and denatured ovalbumin with Congo Red.
J. Amer. Chem. Soc. 74 (1952) 2265.

51. Hanson, P.M.: The adherence of leucocytes and platelets induced by fixed IgG antibody or complement.
Immunol. 16 (1969) 107.
52. Huber, H.; Polley, M.J.; Linscott, W.D.; Fudenberg, H.H.; Müller-Eberhard, H.J.: Human monocytes: Distinct receptor sites for the third component of complement and for immunoglobulin G.
Science 162 (1968) 1281.
53. Ishisaka, T.; Ishisaka, K.; Borsos, T.; Rapp, H.J.: C1-fixation by human isoagglutinins: Fixation of C1 by IgG and IgM, but not by IgA-antibody.
J. Immunol. 97 (1966) 716.
54. Jirgensons, B.: Optical rotation and viscosity of native and denatured proteins. I.: Influence of pH, and the stability of various proteins toward several denaturing reagents.
Arch. Biochem. Biophys. 39 (1952) 261.
55. Jirgensons, B.: Optical rotation of native and denatured proteins. III.: Influence of temperature and concentration.
Arch. Biochem. Biophys. 41 (1952) 333.
56. Johnson, A.R.; Hugli, T.E.; Müller-Eberhard, H.J.: Release of histamine from rat mast cells by the complement peptides C3a and C5a.
Immunol. 28 (1975) 1067.
57. Joly, M.: A physico-chemical approach to the denaturation of proteins.
Academic Press, London, New York (1965).

58. Karlin, A.: Molecular interaction of the acetylcholin-receptor.
Fed. Proc. 32 (1973) 1847.
59. Kauzmann, W.: Some factors in the interpretation of protein denaturation.
Adv. Prot. Chem. 14 (1959) 1.
60. Klein, P.G.; Wellensiek, H.J.: Multiple nature of the third component of guinea-pig complement. I.: Separation and characterization of three factors a, b and c essential for hemolysis.
Immunol. 8 (1965) 590.
61. Kleinwächter, V.: X-ray-diffraction-study on denatured ferritin and apoferritin.
Nature (London) 186 (1960).
62. Klotz, I.U.; Triwusch, H.; Walker, F.M.: The binding of organic ions by proteins. Competition phenomena and denaturation effects.
J. Am. Chem. Soc. 70 (1948) 2935.
63. Kolb, W.P.; Müller-Eberhard, H.J.: The membrane attack mechanism of complement. Isolation and subunit composition of the C5b-9-complex.
J. Exp. Med. 141 (1975) 724.
64. Kolb, W.P.; Müller-Eberhard, H.J.: Mode of action of human C3: Adsorption of multiple C3-molecules to cell-bound C8.
J. Immunol. 113 (1974) 479.
65. Kolb, W.P.; Müller-Eberhard, H.J.: The membrane attack mechanism of complement.
J. Exp. Med. 138 (1973) 438.

66. Kwen-Jen Chang; Jakobs, S.; Cuatrecasas, P.: Quantitative aspects of hormone receptor interactions of high affinity. Effect of receptor concentration and measurement of dissociation constants of labeled and unlabeled hormones. *Biochem. Biophys. Acta* 406 (1975) 94.
67. Kyte, J.: Purification of the sodium and phosphat dependent adenosine triphosphatase from canine renal medulla. *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 4157.
68. Langley, J.N.: In: The pharmacological basis of therapeutics, S. 17, 4th Ed., Macmillan Company, London-Toronto (1978).
69. Langley, J.N.: On the contraction of muscle chiefly in relation of receptive substance. Part IV: The effects of curari and of some other substances on the nicotine response of sartorius and gastrocnemius muscles of the frog. *J. Physiol.* 39 (1909) 325.
70. Lay, W.H.; Nussenzweig, V.: Receptors for complement on leucocytes. *J. Exp. Med.* 128 (1968) 991.
71. Lehninger, A.C.: Biochemistry. Worth-Publishers, S. 79-113 (1970).
72. Leonis, J.: Priliminary investigations of the behaviour of lysoyme in urea-solutions. *Arch. Biochem. Biophys.* 65 (1956) 182.
73. Liebster, J.; Kopoldova, J.: The radiation chemistry of aminoacids. *Adv. Rad. Biol.* 1 (1964) 157.

74. Lindstrom, J.; Patrick, J.: Synaptic transmission of neuronal interaction. (Ed. by Bennett, M.V.L., New York (Raven) (1973)).
75. Loor, F.; Forni, L.; Pernis, B.: The dynamics of the lymphocyte membrane. Factors affecting the distribution and turn-over of surface immunoglobulin.
Eur. J. Immunol. 2 (1972) 203.
76. Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L.: Protein measurement with the folin-phenol-reagent.
J. Biol. Chem. 193 (1951) 265.
77. Lowry, R.; Eyring, H.J.: Conformation changes of proteins.
J. Phys. Chem. 58 (1954) 110.
78. MacLennan, D.H.; Seeman, P.; Iles, G.H.; Yip, C.C.: Membrane formation by the adenosine triphosphatase of sacroplasmic reticulum.
J. Biol. Chem. 246 (1971) 2702.
79. Manni, J.A.; Müller-Eberhard, H.J.: The eightth component of human complement (C8): Isolation, characterization and hemolytic efficiency.
J. Exp. Med. 130 (1969) 1145.
80. Mantovani, B.: Different roles of IgG and complement receptors in phagocytosis by polymorphnuclear leucocytes.
J. Immunol. 115 (1975) 15.
81. Mantovani, B.; Rabinovitsch, M.; Nussenzweig, V.: Phagocytosis of immune complexes by macrophages. Different roles of the macrophage-receptor-sites for complement (C3) and for immunoglobulins (IgG).
J. Exp. Med. 135 (1972) 780.

82. Mayer, M.M.; Croft, C.C.; Gray, M.: Kinetic studies on immune hemolysis.
J. Exp. Med. 88 (1948) 427.
83. Mayer, M.M.: Complement and complement fixation.
In: Kabat, E.A., and Mayer, M.M., Springfield (1961)
Exp. Immunochem., 2nd., S. 133.
84. Mayer, M.M.: Development of the on-hit theory of immune hemolysis. In: Heidelberger M., and Plescia, O.J.:
Immunochemical approaches to problems in microbiology,
S. 286, New Brunswick, N.J. (1961).
85. Mayer, M.M.: Komplement. Das medizinische Prisma.
Boehringer 5 (1975).
86. McConahey, P.J.; Dixon, F.J.: A method of iodination of proteins for immunologic studies.
Int. Arch. Allergy 29 (1966) 185.
87. Medicus, R.G.; Schreiber, R.D.; Götze, O.; Müller-Eberhard, H.J.: A molecular concept of the properdin pathway.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73 (1976) 612.
88. Medicus, R.G.; Götze, O.; Müller-Eberhard, H.J.: Activation of properdin and assembly and regulation of the alternative pathway C5-convertase.
J. Immunol. 116 (1976) 1741.
89. Meuer et al.: The anaphylatoxic peptide C3a of guinea-pig complement. I.: Purification, physico-chemical and antigenetic properties.
Z. Immun. Forsch. 154 (1978) 145.
90. Molenar, J.L.; Helder, A.W.; Müller, M.A.C.; Pondmann, K. W.: Physico-chemical and antigenetic properties of human C3.
Immunochemistry 12 (1975) 359.

91. Müller-Eberhard, H.J.: Nilsson, V.R.; Dalmasso, A.P.; Polly, M.J.; Calcott, M.A.: A molecular concept of immune cytotoxicity.
Arch. Path. 82 (1966) 205.
92. Müller-Eberhard, H.J.: Chemistry and reaction mechanism of complement.
Ad. Immunol. 8 (1968) 1.
93. Müller-Eberhard, H.J.: The possible use of complement for the detection of cell surface antigens.
Cancer Res. 28 (1968) 1357.
94. Müller-Eberhard, H.J.: Complement.
Ann. Rev. Biochem. 44 (1975) 697.
95. Müller-Eberhard, H.J.; Lepow, I.H.: C1-esterase effect on activity and physico-chemical properties of the fourth component of complement.
J. Exp. Med. 121 (1965) 819.
96. Müller-Eberhard, H.J.: Chemistry and function of the complement system. In: Hospital practice, August 1977.
97. Müller-Eberhard, H.J.; Polley, M.; Calcott, M.A.: Formation and functional significance of a molecular complex derived from the second and the fourth component of human complement.
J. Exp. Med. 135 (1967) 359.
98. Needleman, P.: Protein sequence determination.
Heidelberg, Berlin, New York, Springer (1970).
99. Nelson, R.A.: The immune adherence phenomena: An immunologically specific reaction between microorganisms and erythrocytes leading to enhance phagocytosis.
Science 118 (1953) 733.

100. Nelson, R.A.; Nelson, D.S.: On the mechanism of immune adherence. II.: Analogy to mixed aggregation of sensitised antigens in the presence of complement. Immune adherence with animal platelets.
Yale J. Biol. Med. 31 (1959) 201.

101. Nelson, D.S.: Immune adherence.
Ciba Found.-Symp.-Complement, S. 222-241 (Hrsg.: Wolstenholme, G.E.W., and Knight, J., Boston (1965), ed. by Little and Brown & Co.)).

102. Nicol, P.A.E.; Lachmann, P.J.; Rosen, F.S.; Jandl, J.H.: The alternative pathway of complement activation. The role of C3 and its inactivator (KAF).
Immunol. 24 (1973) 259.

103. Nicolson, G.L.: Transmembrane control of the receptors on normal and tumor cells. I.: Cytoplasmatic influence over cell surface components.
Biochem. Biophys. Acta 457 (1976) 57.

104. Nilsson, U.R.; Müller-Eberhard, H.J.: Isolation of β_{1F} -glubulin from human serum and its characterization as the fifth component of complement.
J. Exp. Med. 122 (1965) 277.

105. Nishioka, K.; Linscott, W.D.: Component of guinea-pig complement. I.: Separation of a serum fraction essential for immune hemolysis and immune adherence.
J. Exp. Med. 118 (1963) 767.

106. Okada, H.; Kojima, K.; Yosshida, T.O.; Nishioka, T.: Electrokinetic behaviour of intermediate cells in immune hemolysis.
J. Immunol. 108 (1972) 59.

107. Overton, E.: Über die allgemeinen osmotischen Eigenschaften der Zelle, ihre vermutlichen Ursachen und ihre Bedeutung für die Physiologie.
Vjschr. Naturforsch. Ges. Zürich 44 (1899) 88.
108. Pauling, L.: A theory of the structure and process of formation of antibodies.
J. Am. Chem. Soc. 62 (1940) 2643.
109. Pauling, L.; Campbell, D.H.: The production of antibodies in vitro.
Science 95 (1942) 440.
110. Pepys, B.: Role of complement in induction of the allergic response.
Nature (New Biol.) 237 (1972) 157.
111. Ramachandran, G.N.: Aspects of protein structure.
Academic Press, London-New York (1963).
112. Rapoport, S.M.: Medizinische Biochemie.
Verlag Volk und Gesundheit, Berlin (1973).
113. Reid, K.B.M.; Lowe, D.M.; Porter, R.R.: Isolation and characterization of C1q. A subcomponent of the first component of complement from human and rabbit sera.
Biochem. J. 130 (1972) 749.
114. Rice, S.A.; Wada, A.; Geisushek, E.P.: Some comments on the theory of denaturation.
Discuss. Faraday Soc. 25 (1958) 130.
115. Robertson, J.D.: New observation on the ultrastructure of the membrane of frog peripheral nerve fibers.
J. Biochem. Biophys. Cytol. 3 (1957) 1043.
116. Rodbell, M.: The problem of identifying the glucagon receptor.
Fed. Proc. 32 (1975) 3.

117. Rodboard, D.; Feldmann, A.H.: Theory of protein-ligand-interaction.
Meth. of Enzymol. 36 (1975) 3.
118. Ross, G.D.; Polley, M.J.: Specificity of human lymphocyte complement receptor.
J. Exp. Med. 141 (1975) 1163.
119. Ross, G.D.; Polley, M.J.; Rabellino, E.M.; Grey, H.M.: Two different complement receptors on human lymphocytes.
J. Exp. Med. 138 (1973) 798.
120. Ruddy, S.; Austen, K.F.: C3b-inactivator of man. II.: Fragments produced by C3b-inactivator cleavage of cell-bound or fluid phase C3b.
J. Immunol. 107 (1971) 742.
121. Safar, B.; Bigalow, C.C.: The denatured state of ribonuclease.
Can. J. Biochem. 45 (1967) 651.
122. Scatchard, G.: The attraction of proteins for small molecules and ions.
Ann. N.-York, Acad. Sci. 51 (1949) 660.
123. Schorlemmer, H.U.; Allison, A.C.: Effects of activated complement components on enzyme secretion of macrophages.
J. Immunol. 31 (1976) 786.
124. Schreiber, R.D.; Müller-Eberhard, H.J.: Human C4. Description of a three-polypeptide chain structure.
J. Exp. Med. 140 (1974) 1324.
125. Schreiber, R.D.; Pangburn, U.K.; Lesavre, P.H.; Müller-Eberhard, H.J.: Initiation of the alternative pathway of complement: Recognition of activators by bound C3b and assembly of the entire pathway from six isolated proteins.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75 (1978) 3948.

126. Schüßler, H.; Jung, H.: Strahleninduzierte Aggregation und die Rolle der Disulfidbrücken bei der Inaktivierung von Ribonuklease in wässriger Lösung. In: Molekulare Struktur und Strahlenwirkung, Thieme, Stuttgart, S. 128 (1968).
127. Singer, S.J.; Nicolson, G.L.: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes.
Science 175 (1972) 720.
128. Springer, G.F.: Mammalian erythrocyte receptors: Their nature and their significance in immunopathology.
Bayer-Symposium I, S. 47-62 (1969).
129. Steffer, C.: Strahlenbiochemie.
Heidelberger Taschenbücher, Bd. 59/60, Springer, Berlin, Heidelberg, New York (1969).
130. Steinhardt, J.; Polet, H.; Moezie, F.: Acid denaturation of horse-carbony-hemoglobin in the absence of oxygen.
J. Biol. Chem. 241 (1966) 3988.
131. Stitzel, A.E.; Spitzer, R.E.: The utilization of properdin in the alternative pathway of complement activation: Isolation of properdin-convertase.
J. Immunol. 112 (1974) 56.
132. Tachibana, T.; Tamamushi, K.; Tamamushi, R.: Studies on the interaction of gelatine with lead ion.
J. Biochem. 44 (1957) 33
133. Tack, B.F.; Prahl, J.: The third component of human complement. Purification from plasma and physico-chemical characterization.
Biochem. 15 (1976) 4513.

134. Tanford, C.: Protein denaturation.
Teil A und B: Adv. in Prot. Chem. 23 (1968) 121.
Teil C: Adv. in Prot. Chem. 24 (1970) 1.
135. Tanford, C.: The acid denaturation of ferritin-hemoglobin.
J. Am. Chem. Soc. 79 (1957) 3931.
136. Taranta, A.; Franklin, E.C.: Complement fixation by antibody fragments.
Science 134 (1961) 1981.
137. Taylor, R.B.; Duffus, W.P.H.; Raff, M.C.; de Petris, S.: Redistribution and pinocytosis of lymphocyte surface immunoglobulin-molecules induced by anti-immunglobulin antibody.
Nature New Biol. 233 (1971) 225.
138. Theophilopoulos, A.N.; Bokisch, V.A.; Dixon, F.J.: Receptor for soluble C3 and C3b on human lymphoblastoid (Raji)-cells. Properties and biological significance.
J. Exp. Med. 139 (1974) 696.
139. Timasheff, S.N.; Gibb, P.J.: The state of plasma albumin in acid pH.
Arch. Biochem. Biophys. 70 (1957) 547.
140. Tonomura, G.; Sekiya, K.; Imamura, K.: The optical rotatory dispersion of myosin A.
J. Biol. Chem. 237 (1962) 3110.
141. Uhr, J.W.: Antigen-receptor on murine B and T-lymphocytes. In: Membrane receptors of lymphocytes, S. 3-12 (Hrsg.: Seligmann, M., Preud'homme, J.L., Kaurilsy, F.M., Amsterdam-Oxford: North-Holland Publishing Company, New York: Amsterdam Elsevier Publishing Company.)

142. Van Oss, C.J.; Gillmann, C.F.: Phagocytosis as a surface phenomena. I. and II.
J. of reticuloendothelial Soc. 12 (1972) 283 und 427.
143. Von Hippel, P.H.; Wong, K.J.: On the conformational stability of globular proteins. The effects of various electrolytes and non-electrolytes on the thermal ribonuclease transition.
J. Biol. Chem. 240 (1965) 3909.
144. Von Hippel, P.H.; Wong, K.J.: Natural salts. The generality of their effects on the stability of macromolecular conformations.
Science 145 (1964) 577.
145. Warner, R.C.; Levy, M.: Denaturation of bovine plasma albumin. II.: Isolation of the intermediates and mechanisms of the reaction at pH 7.
146. Weiler, J.M.; Daha, M.R.; Austen, K.F.; Fearon, D.F.: Control of the amplification-convertase of complement by the plasma protein of $\beta 1H$.
Proc. Nat. Acad. Sci. 73 (1976) 3268.
147. Wellensiek, H.J.; Klein, P.G.: Multiple nature of the third component of guinea-pig-complement. II.: Separation and description of two additional factors β and d. Preparation and characterization of four intermediate products.
Immunol. 8 (1965) 604.
148. Whaly, K.; Ruddy, S.: Modulation of C3b hemolytic activity by a plasma-protein distinct from C3b-inactivator.
Science 193 (1976) 1011.
149. Whitehead, H.R.; Gordon, J.; Wormall, A.: The "third complement" or heat-stable-factor of complement.
Biochem. J. (Brit.) 19 (1925) 618.

150. Wilkinson, P.C.: Chemotaxis and inflammation.
Churchill Livingstone, Edinburgh, London (1964).
151. Yang, J.T.; Forster, J.F.: Intrinsic viscosity and optical rotation of proteins in acid media.
J. Am. Chem. Soc. 77 (1955) 2374.
152. Yang, J.T.; Forster, J.F.: Changes in intrinsic viscosity and optical rotation of bovine-plasma-albumin associated with acid binding.
J. Am. Chem. Soc. 76 (1954) 1588.
153. Yee-Hesiung Chen; Jen-Tsi Yang; Martínez, H.M.:
Determination of the secondary structures of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion.
Biochem. J. 11/22 (1972) 4120.
154. Zittle, C.A.; Della Monica, E.S.: The viscosity and opacity of heated β -lactoglobulin-solutions. The effect of salts and oxidizing and reducing reagents.
J. Am. Chem. Soc. 79 (1957) 126.

Zu danken habe ich Herrn Dr. G. Saygin (Institut für Eiweiß und Leder der TH, Darmstadt; Direktor: Herr Prof. Dr. Heidemann) für die Erstellung und Auswertung der CD-Spektren und der Aminosäureanalysen, Herrn Dr. H. Menzel (Paul-Ehrlich-Institut, Frankfurt) für fruchtbare Diskussionen über die Problematik der Ligand-Rezeptorbeziehung sowie Herrn Prof. Dr. M.P. Dierich, der die Anfertigung der Arbeit beaufsichtigte und mich stetig förderte, ermunterte und ermahnte.

L_e_b_e_n_s_l_a_u_f

28. September 1951: Geboren in Laasphe (Nordrhein-Westfalen);
Eltern: Dr. Hermann Steuhl, Studienrat
i.R., und Erika Steuhl, geb. Roth.

Frühjahr 1958: Beginn der Grundschulausbildung.

1965-1970: Besuch des Aufbaugymnasiums Laasphe mit dem Abitur als Abschlußprüfung.

1970-1972: Wehrdienst als Sanitäter bei der Bundeswehr.

1972-1973: Physik- und Chemiestudium an der Philipps-Universität in Marburg.

Sommersemester 1973-

Wintersemester 1978: Studium der Humanmedizin an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz.

April 1978 - Mai 1979: Ableistung des "praktischen Jahres" am Städtischen Krankenhaus Kaiserslautern.

7. Mai 1979: Abschluß des Medizinstudiums mit dem Medizinischen Staatsexamen.

15. Mai 1979: Beginn der theoretischen Ausbildung am Anatomischen Institut der Universität Erlangen-Nürnberg (Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. med. h.c. J.W. Rohen)

Copy-Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197